

KOMMISSJONENS GJENNOMFØRINGSBESLUTNING (EU) 2015/1554**2018/EØS/84/06****av 11. september 2015****om fastsettelse av regler for gjennomføring av direktiv 2006/88/EF med hensyn til krav til overvåking og diagnostiske metoder***[meddelt under nummer K(2015) 6188](*)*

EUROPAKOMMISSJONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den europeiske unions virkemåte,

under henvisning til rådsdirektiv 2006/88/EF av 24. oktober 2006 om helse- og hygienekrav til akvakulturdyr og -produkter og om forebygging og bekjempelse av visse sykdommer hos vanndyr⁽¹⁾, særlig artikkel 49 nr. 3, artikkel 50 nr. 4, artikkel 57 bokstav b) og artikkel 61 nr. 3, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) Ved direktiv 2006/88/EF fastsettes forebyggende minstetiltak for overvåking og tidlig påvisning hos akvatiske dyr av sykdommene oppført i vedlegg IV til nevnte direktiv (heretter kalt «listeførte sykdommer»), og de bekjempelsestiltakene som skal treffes ved mistanke om eller utbrudd av de listeførte sykdommene. I nevnte direktiv er det også fastsatt krav som skal være oppfylt for at medlemsstater eller soner eller segmenter i medlemsstater kan oppnå status som sykdomsfrie.
- 2) Utryddelse av de listeførte sykdommene og oppnåelse av status som sykdomsfri for en medlemsstat, en sone eller et segment bør være basert på de samme prinsippene og følge den samme vitenskapelige framgangsmåten i hele Unionen. Det er derfor nødvendig at det på EU-plan fastsettes særlige krav til utryddelses- og overvåkingsordninger samt de prøvetakingsmetodene og diagnostiske metodene som medlemsstatene skal benytte for å oppnå status som sykdomsfri for hele medlemsstaten eller for en sone eller et segment i medlemsstaten.
- 3) De laboratorieundersøkelsene som skal utføres ved mistanke om eller bekreftet forekomst av de listeførte sykdommene, bør være de samme i hele Unionen og bør følge de samme vitenskapelige standarder og protokoller. I samsvar med direktiv 2006/88/EF må det fastsettes særlige diagnostiske metoder og framgangsmåter som skal benyttes av de laboratoriene som vedkommende myndighet i medlemsstatene har utpekt til dette formålet.
- 4) I helseregulverket for akvatiske dyr vedtatt av Verdens dyrehelseorganisasjon (OIE) (heretter kalt «regulverket for akvatiske dyr»), er det fastsatt standarder for å bedre helsen til akvatiske dyr og velferden til oppdrettsfisk på verdensplan, herunder standarder for sikker internasjonal handel med akvatiske dyr og produkter av disse. Flere av kapitlene i regulverket for akvatiske dyr inneholder anbefalinger om bruk av visse diagnostiske tester. Nevnte tester som fastsettes av OIE, er beskrevet i OIEs «Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals» (heretter kalt «håndboken for akvatiske dyr»). For å sikre at Unionens krav med hensyn til diagnostisering av sykdommer hos akvatiske dyr er i samsvar med internasjonale standarder bør det i reglene som fastsettes ved denne beslutning, tas hensyn til standardene og anbefalingene i regulverket for akvatiske dyr.

(*) Denne unionsrettsakten, kunngjort i EUT L 247 av 23.9.2015, s. 1, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 68/2016 av 29. april 2016 om endring av EØS-avtalens vedlegg I (Veterinære og plantesanitere forhold), se EØS-tillegget til *Den europeiske unions tidende* nr. 73 av 16.11.2017, s. 5.

(¹) EUT L 328 av 24.11.2006, s. 14.

- 5) I håndboken for akvatiske dyr er det for mange av de listeførte sykdommene angitt en rekke tester og framgangsmåter som skal benyttes ved laboratorieundersøkelser. For å sikre et ensartet vitenskapelig grunnlag på EU-plan for det diagnostiske arbeidet i forbindelse med de listeførte sykdommene er det nødvendig å velge blant de diagnostiske testene og framgangsmåtene som anbefales av OIE, og å presisere hvilke tester som bør være obligatoriske ved laboratorieundersøkelser som skal utføres innenfor rammen av overvåkingsprogrammer, og for å utelukke mistanke om eller bekrefte forekomst av en listeført sykdom. Ettersom det i visse tilfeller også vil være behov for å kunne benytte alternative metoder og framgangsmåter, bør det foreligge beskrivelser av og vitenskapelige forklaringer på når og hvordan de alternative metodene kan benyttes. Dette er særlig nødvendig for de mer detaljerte diagnostiske framgangsmåtene.
- 6) For å oppnå nøyaktige og reproduerbare diagnostiske resultater er det viktig at de detaljerte framgangsmåtene og protokollene som skal benyttes, er validert i samsvar med de relevante kvalitetsstandardene omhandlet i del I i vedlegg VI til direktiv 2006/88/EF. For mange av de diagnostiske metodene omhandlet i denne beslutning er bruk av ferdigkjøpte prøvesett en nødvendig del av de diagnostiske protokollene, og nevnte prøvesett er blitt validert i akkrediterte tester utført av Den europeiske unions referanselaboratorier (EURL) for de forskjellige sykdommene. Av hensyn til rettssikkerheten bør disse validerte ferdigkjøpte prøvesettene handelsnavn oppgis i denne beslutning.
- 7) For visse medlemsstater kan det være vanskelig å oppnå status som sykdomsfri for hele medlemsstaten eller for en sone eller et segment i medlemsstaten med hensyn til én eller flere av de listeførte sykdommene. I slike situasjoner kan medlemsstaten foretrekke ikke å oppnå eller gjenopprette status som sykdomsfri for nevnte listeførte sykdommer. Minstetiltakene for bekjempelse som skal anvendes dersom den berørte medlemsstaten ikke ønsker å oppnå eller gjenopprette status som sykdomsfri, bør være de samme i hele Unionen og bør omfattes av samme kriterier. I samsvar med direktiv 2006/88/EF må det derfor fastsettes nærmere regler for å hindre spredning av nevnte listeførte sykdommer og minstekrav for å oppheve slike tiltak for å hindre spredning av sykdom.
- 8) Ved kommisjonsvedtak 2001/183/EF⁽¹⁾ fastsettes krav til prøvetakingsplaner og diagnostiske metoder til påvisning og bekreftelse av de listeførte sykdommene infeksjøs hematopoietisk nekrose og hemoragisk virusseptikemi. Ved kommisjonsvedtak 2003/466/EF⁽²⁾ fastsettes krav til prøvetakingsplaner og diagnostiske metoder til påvisning av infeksjøs lakseanemi samt kriterier for opprettelse av soner og offentlig overvåking ved mistanke om eller bekreftet forekomst av nevnte sykdom. Ved kommisjonsvedtak 2002/878/EF⁽³⁾ fastsettes krav til prøvetakingsplaner og diagnostiske metoder til påvisning og bekreftelse av bløtdyrssykdommene bonamiose og marteiliose. For å ajourføre kravene bør disse tre vedtak erstattes av denne beslutning. Vedtak 2001/183/EF, vedtak 2002/878/EF og vedtak 2003/466/EF bør derfor oppheves.
- 9) Ettersom visse medlemsstater trenger tid for å oppdatere sine nasjonale referanselaboratorier for å oppfylle kravene fastsatt i denne beslutning, bør denne beslutning få anvendelse fra 1. april 2016.
- 10) Tiltakene fastsatt i denne beslutning er i samsvar med uttalelse fra Den faste komité for planter, dyr, næringsmidler og fôr —

TRUFFET DENNE BESLUTNING:

Artikkel 1

Formål

Ved denne beslutning fastsettes regler for

- a) den overvåkingen, de buffersonene, de prøvetakingsmetodene og de diagnostiske metodene som medlemsstatene skal benytte i forbindelse med sykdomsstatusen i medlemsstatene eller soner eller segmenter i medlemsstatene, for de ikke-eksotiske sykdommene som rammer akvatiske dyr og er oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF (heretter kalt «listeførte sykdommer»),

⁽¹⁾ Kommisjonsvedtak 2001/183/EF av 22. februar 2001 om fastsettelse av prøvetakingsplaner og diagnostiske metoder for å påvise og bekrefte forekomst av visse fiskesykdommer, og om oppheving av vedtak 92/532/EØF (EFT L 67 av 9.3.2001, s. 65).

⁽²⁾ Kommisjonsvedtak 2003/466/EF av 13. juni 2003 om fastsettelse av kriterier for opprettelse av soner og offentlig overvåking ved mistanke om eller bekreftet forekomst av infeksjøs lakseanemi (ILA) (EUT L 156 av 25.6.2003, s. 61).

⁽³⁾ Kommisjonsvedtak 2002/878/EF av 6. november 2002 om fastsettelse av prøvetakingsplaner og diagnosemetoder for påvisning og stadfesting av bløtdyrssykdommene bonamiose (*Bonamia ostreae*) og marteiliose (*Marteilia refringens*) (EFT L 305 av 7.11.2002, s. 57).

- b) de diagnostiske metodene som skal benyttes ved laboratorieundersøkelser ved mistanke om eller bekreftet forekomst av listeførte sykdommer, og
- c) de minstetiltakene for bekjempelse som skal anvendes ved mistanke om eller bekreftet forekomst av en listeført sykdom i en medlemsstat, en sone eller et segment som ikke er blitt erklært fri for nevnte listeførte sykdom.

Artikkel 2

Definisjoner

I denne beslutning menes med

- a) «hemoragisk virusseptikemi» («VHS») en sykdom forårsaket av hemoragisk virusseptikemi-virus (VHSV), også kjent som egtvedsykevirus, et virus i slekten *Novirhabdovirus* i familien *Rhabdoviridae*,
- b) «infeksiøs hematopoietisk nekrose» («IHN») en sykdom forårsaket av infeksiøs hematopoietisk nekrose-virus (IHNV), et virus i slekten *Novirhabdovirus* i familien *Rhabdoviridae*,
- c) «koiherpesvirussykdom» («KHVD») en sykdom forårsaket av koiherpesvirus (KHV), et virus i familien *Alloherpesviridae*. Det vitenskapelige navnet er cyprinidherpesvirus 3 (CyHV-3),
- d) «infeksiøs lakseanemi» («ILA») en sykdom forårsaket av infeksjon med HPR-deletert lakseanemivirus (ILAV), et virus i slekten *Isavirus* i familien *Orthomyxoviridae*,
- e) «infeksjon med *Marteilia refringens*» en sykdom forårsaket av infeksjon med protozoen *Marteilia refringens* (Paramyxia),
- f) «infeksjon med *Bonamia ostreae*» en sykdom forårsaket av infeksjon med protozoen *Bonamia ostreae* (Haplosporidia),
- g) «hvitfleksykdom» («WSD») en sykdom forårsaket av hvitfleksyndromvirus (WSSV), et dobbeltrådet DNA-virus i slekten *Whispovirus* i familien *Nimaviridae*.

Artikkel 3

Minstekrav til utryddelses- og overvåkingsprogrammer

Medlemsstatene skal sikre at reglene for overvåkings- og utryddelsesprogrammer, buffersoner, prøvetakingsmetoder og diagnostiske metoder fastsatt i vedlegg I og de særlige metodene og detaljerte framgangsmåtene fastsatt i vedlegg II overholdes når status som sykdomsfri for én eller flere av de listeførte sykdommene skal tildeles, trekkes tilbake eller gjenopprettes for en medlemsstat eller for en sone eller et segment i medlemsstaten.

Artikkel 4

Minstekrav til diagnostiske metoder og særlige framgangsmåter

Medlemsstatene skal sikre at bekjempelsesmetodene fastsatt i vedlegg I og de særlige diagnostiske metodene og detaljerte framgangsmåtene fastsatt i vedlegg II benyttes når det utføres laboratorieundersøkelser for å bekrefte eller utelukke forekomst av en listeført sykdom.

Artikkel 5

Minstetiltak for bekjempelse for å hindre spredning av listeførte sykdommer og minstekrav for å oppheve tiltak mot spredning av sykdom i medlemsstater, soner eller segmenter som ikke er erklært frie for listeførte sykdommer

Medlemsstatene skal sikre at minstetiltakene for bekjempelse og minstekravene for å oppheve tiltakene mot spredning av sykdom fastsatt i vedlegg I overholdes når bekjempelsestiltak gjennomføres, og når tiltak mot spredning av sykdom oppheves for én eller flere av de listeførte sykdommene i en medlemsstat eller i en sone eller et segment i medlemsstaten som ikke er erklært fri for nevnte listeførte sykdommer.

*Artikkel 6***Opphevinger**

Vedtak 2001/183/EF, 2002/878/EF og 2003/466/EF oppheves.

*Artikkel 7***Anvendelsesdato**

Denne beslutning får anvendelse fra 1. april 2016.

*Artikkel 8***Adressater**

Denne beslutning er rettet til medlemsstatene.

Utferdiget i Brussel 11. september 2015.

For Kommisjonen

Vytenis ANDRIUKAITIS

Medlem av Kommisjonen

VEDLEGG I

OVERVÅKING OG BEKJEMPELSESMETODER

I. Innledning

I dette vedlegget fastsettes

- a) krav til utryddelses- og overvåkingsprogrammer, som fastsatt i artikkel 44 i direktiv 2006/88/EF, og prøvetakingsmetoder og diagnostiske metoder som skal benyttes for å erklære status som sykdomsfri for medlemsstater eller for soner eller segmenter i medlemsstater, som fastsatt i kapittel VII i nevnte direktiv,
- b) prøvetakingsmetoder og diagnostiske metoder som skal benyttes ved laboratorieundersøkelser ved mistanke om og for å bekrefte forekomst av de ikke-eksotiske sykdommene som er oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF («listeførte sykdommer»), som fastsatt i artikkel 28 bokstav a) og artikkel 57 bokstav b) i nevnte direktiv,
- c) tiltak mot spredning av sykdom som skal treffes ved bekreftet forekomst av en listeført sykdom, som fastsatt i artikkel 39 i direktiv 2006/88/EF, og tiltak som skal treffes for å oppnå helsestatus i kategori III for en medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V.

Kravene fastsatt i dette vedlegget omfatter følgende listeførte sykdommer:

| | | |
|----|---|-------|
| 1. | Hemoragisk virusseptikemi (VHS) | Del 1 |
| 2. | Infeksiøs hematopoietisk nekrose (IHN) | Del 1 |
| 3. | Koiherpesvirus sykdom (KHVD) | Del 2 |
| 4. | Infeksiøs lakseanemi (ILA) | Del 3 |
| 5. | Infeksjon med <i>Marteilia refringens</i> | Del 4 |
| 6. | Infeksjon med <i>Bonamia ostreae</i> | Del 5 |
| 7. | Hvitfleks sykdom (WSD) | Del 6 |

II. Definisjoner

I vedlegg I og II menes med

- a) «fastlandssegment» ett eller flere akvakulturanlegg beliggende i fastlandsområdet til én eller flere medlemsstater som tilhører et felles biosikkerhetssystem, og som har en bestand av akvatiske dyr med en særlig helsestatus med hensyn til en bestemt sykdom,
- b) «fastlandsanlegg» et akvakulturanlegg der det holdes akvakulturdyr, beliggende i fastlandsområdet til en medlemsstat,
- c) «fastlandssone» et klart avgrenset geografisk område beliggende i fastlandsområdet til én eller flere medlemsstater med et homogent hydrologisk system som omfatter deler av et nedbørfelt fra kilden(e) til en naturlig eller kunstig barriere som hindrer at akvatiske dyr vandrer oppstrøms fra lavereliggende områder av nedbørfeltet, et helt nedbørfelt fra kilden(e) til elvemunningen, eller mer enn ett nedbørfelt, herunder elvemunninger, på grunn av den epidemiologiske forbindelsen mellom nedbørfeltene gjennom elvemunningen,

- d) «akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert» et akvakulturanlegg der det holdes akvatiske dyr, der én eller flere av de listeførte sykdommene er blitt bekreftet av vedkommende myndighet i samsvar med artikkel 28 bokstav a), artikkel 29 og artikkel 57 bokstav b) i direktiv 2006/88/EF,
- e) «kontaktnett» et akvakulturanlegg der det holdes akvatiske dyr, og der det på en eller annen måte er påvist eller er sterk mistanke om kontaminering med infisert materiale fra et akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert.

DEL 1

OVERVÅKING OG METODER TIL BEKJEMPELSE AV HEMORAGISK VIRUSSEPTIKEMI (VHS) OG INFEKSIØS HEMATOPOIETISK NEKROSE (IHN)**I. Krav til overvåkings- og utryddelsesprogrammer for å oppnå og opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til VHS og IHN samt tiltak mot spredning av disse listeførte sykdommene****I.1. Generelle krav til helsekontroller og prøvetaking med hensyn til VHS og IHN:**

- a) Helsekontroller og, dersom det er relevant, prøvetaking skal utføres på den tiden av året da vanntemperaturen er lavere enn 14 °C, eller når som helst på året det er sannsynlig at vanntemperaturen vil være lavest.
- b) Dersom det kreves målrettet overvåking av viltlevende bestander i samsvar med del I nr. 2 annet ledd i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF, skal antallet og den geografiske spredningen av prøvetakingspunktene fastsettes slik at det oppnås en rimelig dekning av medlemsstaten, sonen eller segmentet. Prøvetakingspunktene skal være representative for de forskjellige økosystemene der viltlevende bestander av mottakelige arter finnes.
- c) Dersom det skal foretas helsekontroller eller prøvetaking av akvakulturanlegg eller viltlevende bestander mer enn én gang i året, skal det gå så lang tid som mulig mellom helsekontrollene og mellom hver prøvetaking, men minst fire måneder, idet det tas hensyn til temperaturkravene omhandlet i bokstav a).
- d) Det skal foretas helsekontroller av alle produksjonsenheter, f.eks. dammer, tanker og notposer, med tanke på forekomst av død fisk, svimere eller fisk med unormal atferd. Det skal legges særlig vekt på vannutstrømningsområdet, der svimere har en tendens til å samle seg på grunn av vannstrømmen.
- e) Fisk av mottakelige arter som skal omfattes av prøvetakingen, skal velges på følgende måte:
 - i) Dersom det er regnbueørret på stedet, skal bare fisk av denne arten velges for prøvetaking, unntatt dersom det forekommer andre mottakelige arter som viser typiske tegn på VHS eller IHN. Dersom det ikke er regnbueørret på stedet, må prøven være representativ for alle andre mottakelige arter på stedet.
 - ii) Dersom det forekommer svimere, fisk med unormal atferd eller fisk som nylig er død, men som ikke har gått i oppløsning, skal slik fisk velges. Dersom det benyttes mer enn én vannkilde til fiskeproduksjon, skal fisk fra alle vannkilder inngå i prøven.
 - iii) Fisken som velges, skal omfatte fisk som er tatt ut på en slik måte at alle deler av akvakulturanlegget samt alle årsklasser er proporsjonalt representert i prøven.

I.2. Særlige krav for å oppnå helsestatus som sykdomsfri (kategori I) med hensyn til VHS og IHN**I.2.1. Overvåkingsprogrammer:**

- a) En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori III, som omhandlet i del B i vedlegg III til direktiv 2006/88/EF, med hensyn til VHS eller IHN eller begge, kan oppnå helsestatus i kategori I for disse listeførte sykdommene dersom alle akvakulturanlegg i nevnte medlemsstat, sone eller segment der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til nevnte direktiv, oppfyller kravene fastsatt i vedlegg V til nevnte direktiv, og alle disse akvakulturanleggene og, dersom det kreves i henhold til del I nr. 2 annet ledd i vedlegg V til nevnte direktiv, prøvetakingspunktene i viltlevende bestander utvalgt i samsvar med nevnte del har vært omfattet av ett av følgende overvåkingsprogrammer:

i) Modell A – toårig overvåkingsprogram

Akvakulturanleggene eller prøvetakingspunktene må ha vært omfattet av helsekontroller og prøvetaking i minst to påfølgende år, som fastsatt i tabell 1.A i avsnitt II.

I denne toårsperioden må alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, ha gitt negative resultater for enten VHS eller IHN eller begge, og enhver mistanke om enten VHS eller IHN eller begge må ha blitt utelukket i samsvar med prøvetakingsmetodene og de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.3.

ii) Modell B – fireårig overvåkingsprogram med redusert prøveantall

Akvakulturanleggene eller prøvetakingspunktene må ha vært omfattet av helsekontroller og prøvetaking i minst fire påfølgende år, som fastsatt i tabell 1.B i avsnitt II.

I denne fireårsperioden må alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, ha gitt negative resultater for enten VHS eller IHN eller begge, og enhver mistanke om enten VHS eller IHN eller begge må ha blitt utelukket i samsvar med prøvetakingsmetodene og de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.3.

b) Dersom det i forbindelse med gjennomføringen av overvåkingsprogrammet omhandlet i bokstav a) bekrefte infeksjon med enten VHS eller IHN eller begge på et akvakulturanlegg som omfattes av nevnte overvåkingsprogram, og akvakulturanleggets helsestatus i kategori II derfor er blitt trukket tilbake, kan akvakulturanlegget få tilbake sin helsestatus i kategori II umiddelbart og fortsette gjennomføringen av overvåkingsprogrammet for å oppnå status som sykdomsfri uten å gjennomføre et utryddelsesprogram, som omhandlet i nr. I.2.2, forutsatt at akvakulturanlegget oppfyller følgende vilkår:

i) Det er et fastlandsanlegg hvis helsestatus for enten VHS eller IHN eller begge, er uavhengig av helsestatusen til bestandene av akvatiske dyr i de omkringliggende naturlige vannmassene med hensyn til disse listeførte sykdommene i samsvar med del II nr. 3 i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF.

ii) Anlegget er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt. Brakklaggingen skal vare i minst seks uker.

iii) Det er blitt kultiveringsutsatt med fisk fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I med hensyn til enten VHS eller IHN eller begge.

I.2.2. Utryddelsesprogrammer

I.2.2.1. Generelle krav

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V med hensyn til enten VHS eller IHN eller begge kan oppnå helsestatus i kategori I for disse listeførte sykdommene, forutsatt at alle akvakulturanlegg i nevnte medlemsstat, sone eller segment der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, har vært omfattet av et utryddelsesprogram som oppfyller kravene i bokstav a)–e):

a) Minstetiltakene for bekjempelse fastsatt i kapittel V avsnitt 4 i direktiv 2006/88/EF skal være gjennomført på en effektiv måte, og det skal være opprettet et kontrollområde, som omhandlet i artikkel 32 bokstav b) i nevnte direktiv, som omfatter en vernesone og en overvåkingsone, rundt akvakulturanlegget/-anleggene som offisielt er erklært som infisert med enten VHS eller IHN, eller begge disse listeførte sykdommene.

Kontrollområdet skal defineres i hvert enkelt tilfelle, idet det tas hensyn til faktorer som påvirker risikoen for spredning av den listeførte sykdommen til oppdretts- og villfisk, f.eks. antall, andel og fordeling av døde fisk på det akvakulturanlegget som er infisert med enten VHS eller IHN eller begge, avstand til og tetthet av nærliggende akvakulturanlegg, nærhet til slakterier, kontaktanlegg, arter som forekommer på akvakulturanleggene, oppdrettsmetoder som benyttes på de berørte akvakulturanleggene og på akvakulturanleggene i nærheten av de infiserte akvakulturanleggene, hydrodynamiske forhold og andre faktorer av epidemiologisk betydning som påvises.

Ved opprettelse av verne- og overvåkingssoner skal følgende minstekrav gjelde med hensyn til sonenes geografiske avgrensning:

- i) Det skal opprettes en vernesone i umiddelbar nærhet av et akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med enten VHS eller IHN, eller begge disse listeførte sykdommene, som skal tilsvare følgende:
 - 1) I kystområder: et område innenfor en sirkel med en radius på minst én tidevannsbevegelse eller minst 5 km, alt etter hva som er størst, med sentrum på det akvakulturanlegget som offisielt er erklært som infisert med enten VHS eller IHN eller begge, eller et tilsvarende område fastsatt i henhold til egnede hydrodynamiske eller epidemiologiske data.
 - 2) I områder inne i landet: hele nedbørfeltet for det akvakulturanlegget som offisielt er erklært som infisert med VHS eller IHN eller begge. Vedkommende myndighet kan begrense sonens utstrekning til deler av nedbørfeltet, eller akvakulturanleggets areal, forutsatt at dette ikke svekker tiltakene for å hindre spredning av enten VHS eller IHN eller begge.
- ii) Vedkommende myndighet skal opprette en overvåkingssone utenfor vernesonen som skal tilsvare følgende:
 - 1) I kystområder: et område rundt vernesonen der sonene for tidevannsbevegelsen overlapper vernesonen, eller et område rundt vernesonen innenfor en sirkel med en radius på 10 km fra sentrum av vernesonen, eller et tilsvarende område fastsatt i henhold til egnede hydrodynamiske eller epidemiologiske data.
 - 2) I områder inne i landet: et utvidet område utenfor den opprettede vernesonen.
- b) På alle akvakulturanlegg innenfor vernesonen der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, og som ikke offisielt er erklært som infisert med enten VHS eller IHN eller begge, skal det foretas en offisiell undersøkelse som skal omfatte minst følgende elementer:
 - i) Innsamling av prøver til testing av ti fisk dersom det observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem* som er forenlige med infeksjon med enten VHS eller IHN eller begge, eller minst 30 fisk dersom det ikke observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem*.
 - ii) Én helsekontroll: På de akvakulturanleggene der testene omhandlet i punkt i) har gitt negative resultater, skal helsekontrollene fortsette én gang i måneden på den tiden av året da vanntemperaturen er lavere enn 14 °C, bortsett fra når fiskedammer eller notposer er dekket av is, fram til vernesonen oppheves i samsvar med nr. I.2.2.1 bokstav c).
- c) Alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med enten VHS eller IHN eller begge, skal tømmes, rengjøres, desinfiseres og brakklegges. Brakkleggingen skal vare i minst seks uker. Når alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert innenfor samme vernesone, er tømt, skal de være brakklagt i minst tre uker samtidig. Dette ledd får også anvendelse på nye akvakulturanlegg som offisielt erklæres som infisert i forbindelse med gjennomføringen av utryddelsesprogrammet.

Når akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, brakklegges, skal vernesonene omgjøres til overvåkingssoner.

Vedkommende myndighet kan beslutte å kreve tømming, rengjøring, desinfisering og brakklegging av andre akvakulturanlegg innenfor de opprettede verne- og overvåkingssonene. Hvor lenge disse akvakulturanleggene skal være brakklagt, skal fastsettes av vedkommende myndighet etter en risikovurdering av hvert enkelt tilfelle.

- d) Alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med enten VHS eller IHN eller begge disse listeførte sykdommene, og alle andre akvakulturanlegg som er blitt brakklagt innenfor de opprettede verne- og overvåkingssonene omhandlet i bokstav c), skal kultiveringsutsettes med fisk fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus som sykdomsfri (kategori I) med hensyn til enten VHS eller IHN eller begge.

Kultiveringsutsetting skal først finne sted etter at alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt i samsvar med nr. I.2.2.1 bokstav c).

- e) På alle akvakulturanlegg der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, i medlemsstaten, sonen eller segmentet som omfattes av utryddelsesprogrammet, og dersom det kreves overvåking av villlevende bestander, skal de prøvetakingspunktene som er utvalgt i samsvar med nr. I.1, deretter omfattes av overvåkingsordningen fastsatt i nr. I.2.1.

- I.2.2.2. Krav for å få tilbake status som sykdomsfri for fastlandssegmenter som omfatter ett enkelt akvakulturanlegg som tidligere er blitt erklært som fritt for enten IHN eller VHS eller begge

Et fastlandssegment som omfatter ett enkelt akvakulturanlegg som tidligere er blitt erklært som fritt for enten VHS eller IHN eller begge disse listeførte sykdommene, hvis helsestatus for disse listeførte sykdommene er uavhengig av de omkringliggende naturlige vannmassene i samsvar med del II nr. 3 i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF, og hvis helsestatus i kategori I er blitt trukket tilbake i samsvar med artikkel 53 nr. 3 i nevnte direktiv, kan få tilbake sin helsestatus i kategori I umiddelbart etter at vedkommende myndighet har bekreftet at følgende vilkår er oppfylt:

- a) Det akvakulturanlegget som offisielt er erklært som infisert med enten VHS eller IHN eller begge, må ha blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt. Brakkleggingen skal vare i minst seks uker.
- b) Det akvakulturanlegget som offisielt er erklært som infisert med enten VHS eller IHN eller begge, er blitt kultiveringsutsatt med fisk fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I med hensyn til enten VHS eller IHN eller begge.

- I.3. Særlige krav for å opprettholde helsestatus som sykdomsfri (kategori I) med hensyn til enten VHS eller IHN eller begge

Dersom det kreves målrettet overvåking for å opprettholde helsestatus i kategori I, som fastsatt i artikkel 52 i direktiv 2006/88/EF, skal det på alle akvakulturanlegg der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til nevnte direktiv, i den medlemsstaten, sonen eller det segmentet som er berørt, utføres helsekontroller og prøvetaking av fisk i samsvar med tabell 1.C i avsnitt II i denne del, idet det tas hensyn til akvakulturanleggets risiko for å bli infisert med enten VHS eller IHN eller begge disse listeførte sykdommene.

Ved fastsettelse av hyppigheten av helsekontroller for segmenter beliggende i fastlandsområder med helsestatus i kategori I med hensyn til enten VHS eller IHN eller begge, og hvis helsestatus for VHS eller IHN avhenger av helsestatusen til bestander av akvatiske dyr i omkringliggende naturlige vannmasser i samsvar med del II nr. 2 i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF, skal risikoen for å bli infisert med enten VHS eller IHN eller begge anses som høy.

Status som sykdomsfri skal bare opprettholdes så lenge alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, gir negative resultater for enten VHS eller IHN eller begge disse listeførte sykdommene, og enhver mistanke om enten VHS eller IHN eller begge er blitt utelukket i samsvar med de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.3.

- I.4. Krav for å oppheve tiltak mot spredning av sykdom fastsatt i artikkel 39 i direktiv 2006/88/EF, dvs. endring av helsestatus fra kategori V til kategori III

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V med hensyn til enten VHS eller IHN eller begge kan oppnå helsestatus i kategori III for disse listeførte sykdommene, forutsatt at

- a) kravene fastsatt i nr. I.2.2.1 bokstav a), b) og c) er oppfylt. Dersom brakklegging ikke er teknisk mulig, skal de berørte akvakulturanleggene omfattes av et alternativt tiltak som gir nesten samme garanti for at enten IHN eller VHSV eller begge er utryddet i akvakulturanleggets omgivelser,
- b) alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, og alle andre akvakulturanlegg som er blitt brakklagt / omfattet av alternative tiltak i samsvar med bokstav a) i de opprettede verne- og overvåkingssonene, er blitt kultiveringsutsatt med fisk fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I, II eller III med hensyn til enten VHS eller IHN eller begge,

- c) kultiveringsutsettingen først har funnet sted etter at alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt / omfattet av alternative tiltak i samsvar med bokstav a).

II. Diagnostiske metoder og prøvetakingsmetoder

II.1. Organer det skal tas prøver fra

Vevsmaterialet som skal undersøkes, er milt, fornyre og enten hjerte eller hjerne. Dersom det tas prøver av stamfisk, kan rogn- eller spermvæske også undersøkes.

Dersom det er snakk om småyngel, kan hel fisk med en lengde på under 4 cm findeles med en steril saks eller skalpell etter at den delen av kroppen som er plassert bak gattåpningen, er fjernet. Dersom en prøve består av hel fisk med en kroppslengde på 4–6 cm, skal indre organer, herunder nyre, inngå i prøven.

Organdeler fra høyst ti fisk kan utgjøre en samleprøve.

II.2. Diagnostiske metoder for å oppnå og opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til enten VHS eller IHN eller begge

Den diagnostiske metoden, i samsvar med de godkjente diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i del 1 nr. I i vedlegg II, som skal benyttes for å oppnå eller opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til VHS eller IHN eller begge, skal være enten

- a) virusisolering i cellekulturer etterfulgt av identifisering ved bruk av enzymmerket antistoffprøve (ELISA), indirekte fluorescens-antistoffteknikk (IFAT), virusnøytralisasjonstest eller revers transkriptasepolymerasekjedereaksjon i sanntid (RT-qPCR) eller
- b) RT-qPCR.

II.3. Prøvetakingsmetoder og diagnostiske metoder for å utelukke eller bekrefte forekomst av VHS eller IHN

Dersom det kreves at en mistanke om enten VHS eller IHN eller begge skal bekreftes eller utelukkes i samsvar med artikkel 28 i direktiv 2006/88/EF, skal følgende framgangsmåter for kontroll, prøvetaking og testing benyttes:

- a) På akvakulturanlegget der mistanke forekommer, skal det foretas minst én helsekontroll og én prøvetaking av ti fisk dersom det observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem* som er forenlige med infeksjon med enten VHS eller IHN eller begge, eller minst 30 fisk dersom det ikke observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem*. Prøvene skal analyseres ved hjelp av én eller flere av de diagnostiske metodene som er beskrevet i punkt i) og ii), i samsvar med de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene som er beskrevet i del 1 avsnitt II i vedlegg II:
 - i) Konvensjonell virusisolering i cellekulturer med etterfølgende immunkjemisk eller molekylær virusidentifisering.
 - ii) Viruspåvisning med RT-qPCR.
 - iii) Andre diagnostiske metoder med dokumentert tilsvarende effektivitet, f.eks. indirekte fluorescens-antistoffteknikk (IFAT), enzymmerket antistoffprøve (ELISA), RT-PCR og immunhistokjemi (IHK).
- b) Forekomst av VHS skal anses som bekreftet dersom én eller flere av disse diagnostiske metodene gir positivt resultat for VHSV. Forekomst av IHN skal anses som bekreftet dersom én eller flere av disse diagnostiske metodene gir positivt resultat for IHNV. Bekreftelse av det første tilfellet av VHS eller IHN i medlemsstater, soner eller segmenter som ikke tidligere har vært infisert, skal baseres på konvensjonell virusisolering i cellekultur eller RT-qPCR.
- c) Mistanke om enten VHSV eller IHNV eller begge kan utelukkes dersom resultatene av celledyrking eller RT-qPCR ikke viser ytterligere tegn på forekomst av enten VHSV eller IHNV eller begge.

Tabell 1.A

Overvåkingsordning for soner og segmenter for toårsperioden omhandlet i nr. I.2.1 bokstav a) i) forut for oppnåelse av status som sykdomsfri med hensyn til VHS eller IHN

| Type akvakulturanlegg | Antall helsekontroller per år (2 år) | Antall prøvetakinger per år (2 år) | Antall fisk i prøven ⁽¹⁾ | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|--|---|
| | | | Antall fisk i vekst | Antall stamfisk ⁽²⁾ |
| a) Akvakulturanlegg med stamfisk | 2 | 2 | 50 (første kontroll) 75 (andre kontroll) | 30 (første eller andre kontroll) 0 (første eller andre kontroll) |
| b) Akvakulturanlegg med bare stamfisk | 2 | 1 | 0 | 75 (første eller andre kontroll) |
| c) Akvakulturanlegg uten stamfisk | 2 | 2 | 75 ⁽³⁾ (første og andre kontroll) | 0 |

Høyeste antall fisk per samleprøve: 10

⁽¹⁾ Prøvene skal tas tidligst tre uker etter at fisken er overført fra ferskvann til saltvann.

⁽²⁾ Det skal tas prøver av rogn- eller spermvæske fra stamfisk på modningstidspunktet i forbindelse med stryking.

⁽³⁾ Det skal tas prøver fra det antallet fisk som vil sikre påvisning av VHSV eller IHNV med en konfidens på 95 % dersom antatt prevalens er 5 %.

Tabell 1.B

Overvåkingsordning med redusert prøveantall for fireårsperioden omhandlet i nr. I.2.1 bokstav a) ii) forut for oppnåelse av status som sykdomsfri med hensyn til VHS eller IHN

| Type akvakulturanlegg | Antall helsekontroller per år | Antall prøvetakinger per år | Antall fisk i prøven ⁽¹⁾ | |
|--|-------------------------------|-----------------------------|---|--|
| | | | Antall fisk i vekst | Antall stamfisk ⁽²⁾ |
| De første to årene i overvåkingsperioden | | | | |
| a) Akvakulturanlegg med stamfisk | 2 | 1 | 0 (første kontroll) 30 (andre kontroll) | 0 (første kontroll) 0 (andre kontroll) |
| b) Akvakulturanlegg med bare stamfisk | 2 | 1 | 0 | 30 (første eller andre kontroll) |
| c) Akvakulturanlegg uten stamfisk | 2 | 1 | 30 ⁽³⁾ (første eller andre kontroll) | 0 |
| De siste to årene i overvåkingsperioden | | | | |
| a) Akvakulturanlegg med stamfisk | 2 | 2 | 30 (første kontroll) 0 (andre kontroll) | 0 (første kontroll) 30 (andre kontroll) |

| Type akvakulturanlegg | Antall helsekontroller per år | Antall prøvetakinger per år | Antall fisk i prøven ⁽¹⁾ | |
|---------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--|--------------------------------|
| | | | Antall fisk i vekst | Antall stamfisk ⁽²⁾ |
| b) Akvakulturanlegg med bare stamfisk | 2 | 2 | | 30 (første og andre kontroll) |
| c) Akvakulturanlegg uten stamfisk | 2 | 2 | 30 ⁽³⁾ (første og andre kontroll) | |

Høyeste antall fisk per samleprøve: 10

⁽¹⁾ Prøvene skal tas tidligst tre uker etter at fisken er overført fra ferskvann til saltvann.

⁽²⁾ Det skal tas prøver av rogn- eller spermvæske fra stamfisk på modningstidspunktet i forbindelse med stryking.

⁽³⁾ Det skal tas prøver fra det antallet fisk som vil sikre påvisning av VHSV eller IHNV med en konfidens på 95 % dersom antatt prevalens er 10 %.

Tabell 1.C

Overvåkingsordninger for soner eller segmenter for å opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til VHS eller IHN, som omhandlet i nr. I.3

| Risikonivå | Antall helsekontroller | Antall fisk i prøven ⁽³⁾ |
|------------|------------------------|-------------------------------------|
| Høyt | 2 per år | 30 ⁽¹⁾⁽²⁾ |
| Middels | 1 per år | 30 ⁽¹⁾ |
| Lavt | 1 hvert 2. år | 30 ⁽¹⁾ |

Høyeste antall fisk per samleprøve: 10

⁽¹⁾ Prøvene skal tas tidligst tre uker etter at fisken er overført fra ferskvann til saltvann.

⁽²⁾ Det skal tas prøver fra det antallet fisk som vil sikre påvisning av VHSV eller IHNV med en konfidens på 95 % dersom antatt prevalens er 10 %.

⁽³⁾ Det skal være minst én prøve for hver helsekontroll.

DEL 2

OVERVÅKING OG METODER TIL BEKJEMPELSE AV KOIHERPESVIRUSSYKDOM (KHVD)

I. Krav til overvåkings- og utryddelsesprogrammer for å oppnå og opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til KHVD, samt for å hindre spredning av infeksjon med koiherpesvirus (KHV)

I.1. Generelle krav

Dersom det kreves målrettet overvåking av villlevende bestander i samsvar med del I nr. 2 annet ledd i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF, skal antallet og den geografiske spredningen av prøvetakingspunktene fastsettes slik at det oppnås en rimelig dekning av medlemsstaten, sonen eller segmentet. Prøvetakingspunktene skal også være representative for de forskjellige økosystemene der de villlevende mottakelige bestandene finnes, dvs. elvesystemer og innsjøer.

Den målrettede overvåkingen skal være basert på regelmessig overvåking av steder der det holdes mottakelige arter. Stedene skal overvåkes når vanntemperaturen er tilstrekkelig høy til at sykdommen kan utvikles (> 15 °C), og tidligst to uker etter at denne temperaturen er nådd. Det skal tas prøver til analysering av all syk fisk eller fisk som viser unormal atferd, og som finnes på stedet.

Når det er mulig, skal det tas prøver av fisk som i en lengre periode er blitt holdt ved en temperatur der viruset kan utvikle seg, dvs. 2–3 uker ved 15–26 °C. Følgende metoder kan imidlertid godtas:

- a) Uttak av en delbestand ved overføring fra vinter- til sommerdammer og å holde fisken i samme vannmasse som sommerdammen til minstemperaturen som kreves, er nådd.
- b) Prøvetaking ved innhøsting eller i forbindelse med annen håndtering av fisken som et ledd i vanlige driftsrutiner. Dersom det er mulig, skal prøvene tas 24–72 timer etter nevnte driftsrutiner for å øke sjansen for å påvise KHV.

Dersom det skal utføres helsekontroller eller prøvetaking av akvakulturanlegg eller villlevende bestander mer enn én gang i året, skal det gå så lang tid som mulig mellom helsekontrollene eller mellom hver prøvetaking i den årstiden da det er sannsynlig at vanntemperaturen vil være høyest, men uten at grensen på 28 °C overskrides.

Det skal foretas helsekontroller av alle produksjonsenheter, f.eks. dammer og tanker, med tanke på forekomst av død fisk, svimere eller fisk med unormal atferd.

Dersom *Cyprinus carpio* og hybrider av denne, f.eks. *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, forekommer på akvakulturanlegget, skal det tas prøver av disse.

Fisken som skal omfattes av prøvetakingen, skal velges på følgende måte:

- i) Dersom det forekommer svimere, fisk med unormal atferd eller fisk som nylig er død, men som ikke har gått i oppløsning, skal slik fisk velges.
- ii) Dersom det benyttes mer enn én vannkilde til fiskeproduksjon, skal fisk fra alle vannkilder inngå i prøvetakingen.
- iii) Fisken som velges, må omfatte fisk som er tatt ut på en slik måte at alle deler av akvakulturanlegget samt alle årsklasser er proporsjonalt representert i prøven.

I.2. Særlige krav for å oppnå helsestatus som sykdomsfri (kategori I) med hensyn til KHVD

I.2.1. Overvåkingsprogrammer

- a) En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori III med hensyn til KHVD kan oppnå helsestatus i kategori I dersom alle akvakulturanlegg i nevnte medlemsstat, sone eller segment der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, oppfyller kravene for å oppnå status som sykdomsfri som fastsatt i vedlegg V til nevnte direktiv, og alle disse akvakulturanleggene og, dersom det kreves i henhold til del I nr. 2 annet ledd i nevnte vedlegg, prøvetakingspunktene i villlevende bestander utvalgt i samsvar med nevnte del har vært omfattet av et av følgende overvåkingsprogrammer:

- i) Modell A – toårig overvåkingsprogram

Akvakulturanleggene eller prøvetakingspunktene må ha vært omfattet av helsekontroller og prøvetaking i minst to påfølgende år, som fastsatt i tabell 2.A i avsnitt III.

I denne toårsperioden må alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, ha gitt negative resultater for KHV, og enhver mistanke om KHVD må ha blitt utelukket i samsvar med de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. III.2.

ii) Modell B – fireårig overvåkingsprogram med redusert prøveantall

Akvakulturanleggene eller prøvetakingspunktene må ha vært omfattet av helsekontroller og prøvetaking i minst fire påfølgende år, som fastsatt i tabell 2.B i avsnitt III.

I denne fireårsperioden må alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, ha gitt negative resultater for KHV, og enhver mistanke om KHVD må ha blitt utelukket i samsvar med de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. III.2.

b) Dersom det i forbindelse med gjennomføringen av det fireårige overvåkingsprogrammet omhandlet i bokstav a) bekreftes infeksjon med KHV på et akvakulturanlegg som omfattes av nevnte overvåkingsprogram, og anleggets helsestatus i kategori II derfor er blitt trukket tilbake, kan akvakulturanlegget få tilbake sin helsestatus i kategori II umiddelbart og fortsette gjennomføringen av overvåkingsprogrammet for å oppnå status som sykdomsfri uten å gjennomføre et utryddelsesprogram, som beskrevet i nr. I.2.2, forutsatt at akvakulturanlegget oppfyller følgende vilkår:

i) Det er et fastlandsanlegg hvis helsestatus for KHVD er uavhengig av helsestatusen til bestandene av akvatiske dyr i de omkringliggende naturlige vannmassene med hensyn til denne listeførte sykdommen i samsvar med del II nr. 3 i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF.

ii) Anlegget er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt. Brakkleggingen skal vare i minst seks uker.

iii) Det er blitt kultiveringsutsatt med fisk fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I med hensyn til KHVD.

I.2.2. Utryddelsesprogrammer

I.2.2.1. Generelle krav

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V med hensyn til KHVD kan oppnå helsestatus i kategori I for denne listeførte sykdommen dersom alle akvakulturanlegg i nevnte medlemsstat, sone eller segment der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, har vært omfattet av minst følgende utryddelsesprogram:

a) Minstetiltakene for bekjempelse fastsatt i kapittel V avsnitt 4 i direktiv 2006/88/EF skal være gjennomført på en effektiv måte, og det skal være opprettet et kontrollområde, som omhandlet i artikkel 32 bokstav b) i nevnte direktiv, som omfatter en vernesone og en overvåkingszone, rundt akvakulturanlegget/-anleggene som offisielt er erklært som infisert med KHV.

Kontrollområdet skal defineres i hvert enkelt tilfelle, idet det tas hensyn til faktorer som påvirker risikoen for spredning av KHVD til oppdretts- og villfisk, f.eks. antall, andel og fordeling av døde fisk på det akvakulturanlegget som er infisert med KHV, avstand til og tetthet av nærliggende akvakulturanlegg, nærhet til slakterier, kontaknanlegg, arter som forekommer på akvakulturanleggene, oppdrettsmetoder som benyttes på de berørte og nærliggende akvakulturanleggene, hydrodynamiske forhold og andre faktorer av epidemiologisk betydning som påvises.

Ved opprettelse av verne- og overvåkingssoner skal følgende minstekrav gjelde med hensyn til sonenes geografiske avgrensning:

i) Det skal opprettes en vernesone i umiddelbar nærhet av et akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med KHV, som skal tilsvare hele nedbørfeltet til det akvakulturanlegget som offisielt er erklært som infisert med KHV. Vedkommende myndighet kan begrense sonens utstrekning til deler av nedbørfeltet, forutsatt at dette ikke svekker tiltakene for å hindre spredning av KHVD.

ii) Det skal opprettes en overvåkingszone utenfor vernesonen som skal tilsvare et utvidet område rundt den opprettede vernesonen.

- b) På alle akvakulturanlegg innenfor vernesonene der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, og som ikke offisielt er erklært som infisert med KHV, skal det foretas en offisiell undersøkelse som skal omfatte minst følgende elementer:
- i) Innsamling av prøver til testing av ti fisk dersom det observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem* som er forenlige med KHVD, eller 30 fisk dersom det ikke observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem*.
 - ii) Én helsekontroll: På de akvakulturanleggene der testene omhandlet i nr. III.2 har gitt negative resultater, skal helsekontrollene fortsette én gang i måneden på den tiden av året da det er sannsynlig at vanntemperaturen vil være > 15 °C, fram til vernesonene oppheves i samsvar med nr. I.2.2.1 bokstav c).
- c) Alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med KHV, skal tømmes, rengjøres, desinfiseres og brakklegges. Brakkleggingen skal vare i minst seks uker. Når alle akvakulturanlegg innenfor samme vernesone som offisielt er erklært som infisert, er tømt, skal de være brakklagt i minst tre uker samtidig. Dette ledd får også anvendelse på nye akvakulturanlegg som offisielt erklæres som infisert i forbindelse med gjennomføringen av utryddelsesprogrammet.

Når akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, brakklegges, skal vernesonene omgjøres til overvåkingssoner.

Vedkommende myndighet kan beslutte å kreve tømning, rengjøring, desinfisering og brakklegging av andre akvakulturanlegg innenfor de opprettede verne- og overvåkingssonene. Brakkleggingens varighet skal fastsettes av vedkommende myndighet etter en risikovurdering av hvert enkelt tilfelle.

- d) Alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med KHV, og alle andre akvakulturanlegg som er blitt brakklagt i de opprettede verne- og overvåkingssonene, skal kultiveringsutsettes
- i) med fisk fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I med hensyn til KHVD, eller
 - ii) i en overgangsperiode fram til 31. desember 2020, med fisk fra medlemsstater, soner eller segmenter med et godkjent program for overvåking av KHVD.

Kultiveringsutsetting skal bare finne sted når alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med KHV, er tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt i samsvar med nr. I.2.2.1 bokstav c).

- e) På alle akvakulturanlegg der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, i medlemsstaten, sonen eller segmentet som omfattes av utryddelsesprogrammet, og dersom det kreves overvåking av villlevende bestander, skal de prøvetakingspunktene som er utvalgt i samsvar med nr. I.1, deretter ha vært omfattet av minst overvåkingssystemet fastsatt i nr. I.2.1.

I.2.2.2. Krav for å få tilbake status som sykdomsfri for fastlandssegmenter som omfatter ett enkelt akvakulturanlegg som tidligere er blitt erklært fritt for KHVD

Et fastlandssegment som omfatter ett enkelt akvakulturanlegg med helsestatus i kategori I med hensyn til KHVD, hvis helsestatus for KHVD er uavhengig av de omkringliggende naturlige vannmassene i samsvar med del II nr. 3 i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF, og hvis status i kategori I er blitt trukket tilbake i samsvar med artikkel 53 nr. 3 i nevnte direktiv, kan få tilbake sin helsestatus i kategori I med hensyn til KHVD umiddelbart etter at vedkommende myndighet har bekreftet at følgende vilkår er oppfylt:

- a) Anlegget er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt. Brakkleggingen skal vare i minst seks uker.
- b) Det er blitt kultiveringsutsatt med fisk fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I eller fra segmenter med et godkjent program for overvåking av KHVD (helsestatus i kategori II).

I.3. Særlige krav for å opprettholde helsestatus i kategori I med hensyn til KHVD

Dersom det kreves målrettet overvåking for å opprettholde helsestatus i kategori I, som fastsatt i artikkel 52 i direktiv 2006/88/EF, skal det på alle akvakulturanlegg der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til nevnte direktiv, i den medlemsstaten, sonen eller det segmentet som er berørt, foretas helsekontroller og prøvetaking i samsvar med tabell 2.B i avsnitt III i denne del, idet det tas hensyn til akvakulturanleggets risiko for å bli infisert med KHV.

For segmenter beliggende i fastlandsområder med status i kategori I med hensyn til KHVD, og som omfatter ett eller flere akvakulturanlegg hvis helsestatus for KHVD avhenger av helsestatusen for denne listeførte sykdommen i de omkringliggende naturlige vannmassene i samsvar med del II nr. 2 i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF, skal hyppigheten av helsekontrollene tilsvare det antallet som er fastsatt for risikonivået Høyt i tabell 2.C.

I medlemsstater, soner eller segmenter der antall akvakulturanlegg er begrenset og målrettet overvåking av disse anleggene ikke frambringer tilstrekkelige epidemiologiske data, skal overvåkingsordningene med henblikk på å opprettholde status som sykdomsfri omfatte de prøvetakingspunktene som er utvalgt i samsvar med kravene fastsatt i nr. I.1.

Nevnte prøvetakingspunkter skal omfattes av kontroller og prøvetaking i henhold til en rotasjonsordning (50 % av prøvetakingspunktene hvert år). Prøvetakingen skal utføres i samsvar med tabell 2.C i avsnitt III. Prøvene skal velges ut, tillages og undersøkes som beskrevet i avsnitt II, og laboratorieundersøkelsene skal gi negative resultater med hensyn til forekomst av KHVD-agens.

Status som sykdomsfri skal bare opprettholdes så lenge alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, gir negative resultater for KHVD, og enhver mistanke om KHVD er blitt utelukket i samsvar med de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. III.2.

I.4. Særlige krav for å oppheve tiltak mot spredning av sykdom fastsatt i artikkel 39 i direktiv 2006/88/EF for å oppnå helsestatus i kategori III med hensyn til KHVD i medlemsstater, segmenter eller soner med helsestatus i kategori V

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V med hensyn til KHVD kan oppnå helsestatus i kategori III for denne listeførte sykdommen, forutsatt at

- a) kravene fastsatt i nr. I.2.2.1 bokstav a), b) og c) er oppfylt; dersom brakklegging ikke er teknisk mulig, skal de berørte akvakulturanleggene omfattes av et alternativt tiltak som gir nesten samme garanti for at KHV er utryddet i akvakulturanleggets omgivelser,
- b) alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, og alle andre akvakulturanlegg som er blitt brakklagt / omfattet av alternative tiltak i samsvar med bokstav a) i de opprettede verne- og overvåkingssonene, er blitt kultiveringsutsatt med fisk fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I, II eller III med hensyn til KHVD,
- c) kultiveringsutsettingen først har funnet sted etter at alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt / omfattet av alternative tiltak i samsvar med bokstav a).

II. **Diagnostiske metoder og prøvetakingsmetoder til overvåking for å oppnå og opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til KHVD**

II.1. Prøver

Vevsmaterialet som skal undersøkes, skal være deler av gjeller og nyre. Organdeler fra høyst to fisk kan utgjøre en samleprøve.

II.2. Diagnostiske metoder til overvåking for å oppnå og opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til KHVD

Den diagnostiske metoden som skal benyttes for å oppnå eller opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til KHVD, skal være sanntids-PCR (qPCR) i samsvar med de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i del 2 nr. II i vedlegg II.

III. Diagnostiske metoder og prøvetakingsmetoder til offisielle undersøkelser med henblikk på å bekrefte eller utelukke mistanke om KHVD

III.1. Prøver

Vevsmaterialet som skal undersøkes, skal være deler av gjeller og nyre. Organdeler fra høyst to fisk kan utgjøre en samleprøve.

III.2. Offisiell undersøkelse og diagnostiske metoder for å utelukke og bekrefte forekomst av infeksjon med KHV

Dersom det kreves at en mistanke om KHVD skal bekreftes eller utelukkes i samsvar med artikkel 28 i direktiv 2006/88/EF, skal følgende framgangsmåter for kontroll, prøvetaking og testing benyttes:

- a) Den offisielle undersøkelsen skal omfatte minst én helsekontroll og én prøvetaking av ti fisk dersom det observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem* som er forenlige med infeksjon med KHV, eller 30 fisk dersom det ikke observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem*. Prøvene skal analyseres ved bruk av den diagnostiske metoden som er beskrevet i bokstav b), i samsvar med de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i del 2 nr. II i vedlegg II.
- b) Forekomst av infeksjon med KHV skal anses som bekreftet dersom KHV påvises med PCR.

Mistanke om KHVD kan utelukkes dersom denne testen ikke viser ytterligere tegn på forekomst av KHV.

Tabell 2.A

Overvåkingsordning for soner og segmenter for toårsperioden forut for oppnåelse av status som sykdomsfri med hensyn til KHVD, som omhandlet i nr. I.2.1

| | | Antall kliniske kontroller per år (2 år) | Antall laboratorieundersøkelser per år (2 år) | Antall fisk i prøven |
|-------------------------------------|--|--|---|----------------------|
| Akvakulturanlegg/prøvetakingssteder | De første to årene i overvåkingsperioden | 2 | 2 | 75 ⁽¹⁾ |
| | Høyeste antall fisk per samleprøve: 2 | | | |

(¹) Det skal tas prøver fra det antallet fisk som vil sikre påvisning av KHV med en konfidens på 95 % dersom antatt prevalens er 5 %.

Tabell 2.B

Overvåkingsordning for soner og segmenter for fireårsperioden forut for oppnåelse av status som sykdomsfri med hensyn til KHVD, som omhandlet i nr. I.2.1

| | | Antall kliniske kontroller per år | Antall laboratorieundersøkelser per år | Antall fisk i prøven |
|-------------------------------------|--|-----------------------------------|--|----------------------|
| Akvakulturanlegg/prøvetakingssteder | De første to årene i overvåkingsperioden | 1 | 1 | 30 |
| Akvakulturanlegg/prøvetakingssteder | De siste to årene i overvåkingsperioden | 2 | 2 | 30 |
| | Høyeste antall fisk per samleprøve: 2 | | | |

Tabell 2.C

Overvåkingsordninger for soner eller segmenter for å opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til KHVD, som omhandlet i nr. I.3

| Risikonivå | Antall helsekontroller | Antall fisk i prøven |
|------------|------------------------|----------------------|
| Høyt | 2 per år | 30 |
| Middels | 1 per år | 30 |
| Lavt | 1 hvert 2. år | 30 |

Høyeste antall fisk per samleprøve: 2

Tabell 2.D

Overvåkingsordning for å opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til KHVD i medlemsstater, soner eller segmenter der antall akvakulturanlegg er begrenset, og der målrettet overvåking av disse akvakulturanleggene ikke frambringer tilstrekkelige epidemiologiske data, som omhandlet i nr. I.3

| | Antall kliniske kontroller per år | Antall laboratorieundersøkelser per år | Antall fisk i prøven |
|---------------------|-----------------------------------|--|----------------------|
| Prøvetakingspunkter | 1 hvert 2. år | 1 hvert 2. år | 30 |

Høyeste antall fisk per samleprøve: 2

DEL 3

OVERVÅKING OG METODER TIL BEKJEMPELSE AV INFEKSIØS LAKSEANEMI (ILA)**I. Krav til overvåkings- og utryddelsesprogrammer for å oppnå og opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til ILA, samt for å hindre spredning av infeksjon med HPR-deletert ILAV****I.1. Generelle krav**

Dersom det i samsvar med del I nr. 2 annet ledd i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF kreves at det utføres helsekontroller og prøvetaking av akvakulturanlegg mer enn én gang i året, skal det gå så lang tid som mulig mellom helsekontrollene eller mellom hver prøvetaking.

Dersom det kreves målrettet overvåking av viltlevende bestander i samsvar med del I nr. 2 annet ledd i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF, skal antallet og den geografiske spredningen av prøvetakingspunktene fastsettes slik at det oppnås en rimelig dekning av medlemsstaten, sonen eller segmentet. Prøvetakingspunktene skal også være representative for de forskjellige økosystemene der de viltlevende mottakelige bestandene finnes.

Helsekontrollene skal utføres i alle produksjonsheter, f.eks. dammer, tanker og notposer, med henblikk på forekomst av død fisk, svimere eller fisk med unormal atferd. Det skal legges særlig vekt på vannutstrømningsområdet, der svimere har en tendens til å samle seg på grunn av vannstrømmen.

Fisken som skal omfattes av prøvetakingen, skal velges på følgende måte:

- a) Bare døende eller nylig død fisk, men som ikke har gått i oppløsning, skal velges, og særlig fisk som viser tegn på anemi, blødninger eller andre kliniske tegn som tyder på sirkulasjonsforstyrrelser, skal prioriteres.
- b) Dersom atlantehavslaks er blant de mottakelige artene på stedet, skal prøver fra atlantehavslaks prioriteres. Dersom det ikke er atlantehavslaks på anlegget, skal det tas prøver av andre mottakelige arter.
- c) Dersom det benyttes mer enn én vannkilde til fiskeproduksjon, skal fisk fra alle vannkilder inngå i prøven.
- d) Fisken som velges, skal omfatte fisk som er tatt ut på en slik måte at alle produksjonseenheter, f.eks. notposer, tanker og dammer, på anlegget samt alle årsklasser er proporsjonalt representert i prøven.

I.2. Særlige krav for å oppnå helsestatus i kategori I med hensyn til ILA

I.2.1. Overvåkingsprogrammer

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori III i samsvar med del B i vedlegg III til direktiv 2006/88/EF med hensyn til ILA kan oppnå helsestatus i kategori I for denne listeførte sykdommen dersom alle akvakulturanlegg i medlemsstaten, sonen eller segmentet der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, oppfyller de relevante kravene som er fastsatt i vedlegg V til nevnte direktiv, og alle disse akvakulturanleggene og, dersom det kreves i henhold til del I nr. 2 annet ledd i vedlegg V til nevnte direktiv, prøvetakingspunktene i villlevende bestander utvalgt i samsvar med nevnte nummer har vært omfattet av følgende overvåkingsprogram:

- a) Akvakulturanleggene eller prøvetakingspunktene har vært omfattet av helsekontroller og prøvetaking i minst to påfølgende år, som fastsatt i tabell 3.A i avsnitt II.
- b) I nevnte toårsperiode må alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, ha gitt negative resultater for HPR-deletert ILAV, og enhver mistanke om ILA må ha blitt utelukket i samsvar med de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.3.
- c) Dersom det i forbindelse med gjennomføringen av overvåkingsprogrammet bekreftes forekomst av ILA på et akvakulturanlegg som omfattes av nevnte overvåkingsprogram, og akvakulturanleggets helsestatus i kategori II derfor er blitt trukket tilbake, skal det ha vært gjennomført et utryddelsesprogram i samsvar med nr. I.2.2.

I.2.2. Utryddelsesprogrammer

I.2.2.1. Generelle krav

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V med hensyn til ILA kan oppnå helsestatus i kategori I for denne listeførte sykdommen dersom alle akvakulturanlegg i medlemsstaten, sonen eller segmentet der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, har vært omfattet av et utryddelsesprogram som oppfyller kravene i bokstav a)–e) nedenfor.

- a) Minstetiltakene for bekjempelse fastsatt i kapittel V avsnitt 3 i direktiv 2006/88/EF skal være gjennomført på en effektiv måte, og det skal særlig være opprettet et kontrollområde, som omhandlet i artikkel 32 bokstav b) i nevnte direktiv, som omfatter en vernesone og en overvåkingszone, rundt akvakulturanlegget/-anleggene som offisielt er erklært som infisert med HPR-deletert ILAV eller bekreftet ILA.

Kontrollområdet skal defineres i hvert enkelt tilfelle, idet det tas hensyn til faktorer som påvirker risikoen for spredning av ILA til oppdretts- eller villfisk, f.eks. antall, andel og fordeling av døde fisk på det akvakulturanlegget som er infisert med HPR-deletert ILAV eller bekreftet ILA, avstand til og tetthet av nærliggende akvakulturanlegg, nærhet til slakterier, kontaknanlegg, arter som forekommer på akvakulturanleggene, oppdrettsmetoder som benyttes på de berørte og nærliggende akvakulturanleggene, hydrodynamiske forhold og andre faktorer av epidemiologisk betydning som påvises.

Ved opprettelse av verne- og overvåkingssoner skal følgende minstekrav gjelde med hensyn til sonenes geografiske avgrensning:

- i) Det skal opprettes en vernesone i umiddelbar nærhet av et akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med ILA, som skal tilsvare følgende:
 - 1) I kystområder: et område innenfor en sirkel med en radius på minst én tidevannsbevegelse eller minst 5 km, alt etter hva som er størst, med sentrum på det akvakulturanlegget som offisielt er erklært som infisert med ILA, eller et tilsvarende område fastsatt i henhold til egnede hydrodynamiske eller epidemiologiske data.
 - 2) I områder inne i landet: hele nedbørfeltet for det akvakulturanlegget som offisielt er erklært som infisert med ILA. Vedkommende myndighet kan begrense sonens utstrekning til deler av nedbørfeltet, forutsatt at dette ikke svekker tiltakene for å hindre spredning av ILA.
- ii) Det skal opprettes en overvåkingssone utenfor vernesonen som skal tilsvare følgende:
 - 1) I kystområder: et område rundt vernesonen der sonene for tidevannsbevegelsen overlapper vernesonen, eller et område rundt vernesonen innenfor en sirkel med en radius på 10 km fra sentrum av vernesonen, eller et tilsvarende område fastsatt i henhold til egnede hydrodynamiske eller epidemiologiske data.
 - 2) I områder inne i landet: et utvidet område utenfor den opprettede vernesonen.
- b) På alle akvakulturanlegg innenfor vernesonen der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, og som ikke offisielt er erklært som infisert med ILA, skal det foretas en offisiell undersøkelse som skal omfatte minst følgende elementer:
 - i) Innsamling av prøver til testing av minst ti døende fisk dersom det observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem* som er forenlige med ILA, eller minst 30 fisk dersom det ikke observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem*.
 - ii) Én helsekontroll: På de akvakulturanleggene der testene omhandlet i punkt i) har gitt negative resultater, skal helsekontrollene fortsette én gang i måneden fram til vernesonen oppheves i samsvar med nr. I.2.2.1 bokstav c).
- c) Alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med HPR-deletert ILAV eller bekreftet ILA, skal tømmes, rengjøres, desinfiseres og brakklegges i minst tre måneder. Verne- og overvåkingssonene kan oppheves når alle akvakulturanlegg i vernesonen er blitt tømt, rengjort, desinfisert og deretter brakklagt samtidig i minst seks uker.

Når akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, brakklegges, skal vernesonene omgjøres til overvåkingssoner.

Vedkommende myndighet kan beslutte å kreve tømning, rengjøring, desinfisering og brakklegging av andre akvakulturanlegg innenfor de opprettede verne- og overvåkingssonene. Hvor lenge disse akvakulturanleggene skal være brakklagt, skal fastsettes av vedkommende myndighet etter en risikovurdering av hvert enkelt tilfelle.
- d) Alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med HPR-deletert ILAV eller bekreftet ILA, og alle andre akvakulturanlegg som er blitt brakklagt innenfor de opprettede verne- og overvåkingssonene, skal kultiveringsutsettes med fisk fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I med hensyn til ILA.

Kultiveringsutsetting skal først finne sted etter at alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt i samsvar med nr. I.2.2.1 bokstav c).
- e) På alle akvakulturanlegg der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, i medlemsstaten, sonen eller segmentet som omfattes av utryddelsesprogrammet, og dersom det kreves overvåking av viltlevende bestander, skal de prøvetakingspunktene som er utvalgt i samsvar med nr. I.1, deretter omfattes av overvåkingsordningen omhandlet i nr. I.2.1.

I.2.2.2. Krav for å få tilbake status som sykdomsfri for fastlandssegmenter som omfatter ett enkelt akvakulturanlegg som tidligere har hatt helsestatus i kategori I

Et fastlandssegment som omfatter ett enkelt akvakulturanlegg med helsestatus i kategori I med hensyn til ILA, hvis helsestatus er uavhengig av de omkringliggende naturlige vannmassene i samsvar med del II nr. 3 i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF, og hvis helsestatus i kategori I er blitt trukket tilbake i samsvar med artikkel 53 nr. 3 i nevnte direktiv, kan få tilbake sin helsestatus i kategori I umiddelbart etter at vedkommende myndighet har bekreftet at følgende vilkår er oppfylt:

- a) Anlegget er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt. Brakklaggingen skal vare i minst seks uker.
- b) Det er blitt kultiveringsutsatt med fisk fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I med hensyn til ILA.

I.3. Minstetiltak for bekjempelse for å opprettholde helsestatus i kategori I med hensyn til ILA

Dersom det kreves målrettet overvåking for å opprettholde helsestatus i kategori I, som fastsatt i artikkel 52 i direktiv 2006/88/EF, skal det på alle akvakulturanlegg der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til nevnte direktiv, i den medlemsstaten, sonen eller det segmentet som er berørt, foretas helsekontroller og prøvetaking i samsvar med tabell 3.B⁽¹⁾ i avsnitt II i denne del, idet det tas hensyn til akvakulturanleggets risiko for å bli infisert med ILA.

Ved fastsettelse av hyppigheten av helsekontroller for segmenter beliggende i fastlandsområder med helsestatus i kategori I med hensyn til ILA, hvis helsestatus for ILA er avhengig av helsestatusen til omkringliggende naturlige vannmasser som huser atlantehavslaks (*Salmo salar*), skal risikoen for å bli infisert med ILA anses som høy.

Status som sykdomsfri med hensyn til ILA kan bare opprettholdes så lenge alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, har gitt negative resultater for HPR-deletert ILAV, og enhver mistanke om ILA er blitt utelukket i samsvar med de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.3.

I.4. Særlige krav for å oppnå helsestatus i kategori III med hensyn til HPR-deletert ILAV i medlemsstater, soner eller segmenter som tidligere har hatt helsestatus i kategori V

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V med hensyn til ILA kan oppnå helsestatus i kategori III, forutsatt at

- a) kravene fastsatt i nr. I.2.2.1 bokstav a), b) og c) er oppfylt. Dersom brakklagging ikke er teknisk mulig, skal akvakulturanleggene omfattes av et alternativt tiltak som gir nesten samme garanti for at ILAV er utryddet i akvakulturanleggets omgivelser,
- b) alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, og alle andre akvakulturanlegg som er blitt brakklagt, eller som har vært omfattet av alternative tiltak i samsvar med bokstav a) i de opprettede verne- og overvåkingssonene, er blitt kultiveringsutsatt med fisk fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I, II eller III med hensyn ILA,
- c) kultiveringsutsettingen først har funnet sted etter at alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt / omfattet av alternative tiltak i samsvar med bokstav a),
- d) det ikke har vært bekreftet forekomst av HPR-deletert ILAV i den toårsperioden som følger etter gjennomføring av tiltakene omhandlet i bokstav a), b) og c), og mistankene i denne perioden er blitt utelukket i samsvar med framgangsmåtene beskrevet i nr. II.3.

⁽¹⁾ Skal ikke gjelde for akvakulturanlegg der det bare oppdrettes regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) eller brunørret (*Salmo trutta*) eller begge, og der vannforsyningen utelukkende er basert på ferskvannskilder som ikke huser atlantehavslaks (*Salmo salar*).

II. Diagnostiske metoder og offisielle undersøkelser

II.1. Prøver

Vevsmaterialet som skal undersøkes, skal være

- a) histologi: fornyre, lever, hjerte, bukspyttkjertel, tarm, milt og gjeller,
- b) immunhistokjemi: mellomnyre og hjerte, herunder klaffer og *bulbus arteriosus*,
- c) RT-qPCR-analyse: mellomnyre og hjerte,
- d) viruskultur: mellomnyre, hjerte, lever og milt.

Organdeler fra høyst fem fisk kan utgjøre en samleprøve.

II.2. Diagnostiske metoder for å oppnå eller opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til ILA

Den diagnostiske metoden som skal benyttes for å oppnå eller opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til ILA i samsvar med nr. I.2 og I.3, skal være RT-qPCR etterfulgt av sekvensering av positive prøver i samsvar med de detaljerte metodene og framgangsmåtene som er beskrevet i del 3 i vedlegg II.

Dersom RT-qPCR gir positivt resultat, skal ytterligere prøver analyseres før de innledende bekjempelsestiltakene fastsatt i artikkel 28 i direktiv 2006/88/EF iverksettes.

Prøvene skal analyseres som følger, i samsvar med de detaljerte metodene og framgangsmåtene som er beskrevet i del 3 i vedlegg II:

- a) screening av prøvene med RT-qPCR, herunder sekvensering av HE-genet for å bekrefte HPR-delesjon,
og
- b) undersøkelse i vevspreparater ved hjelp av spesifikke antistoffer mot ILAV (dvs. IHK på fikserte snitt eller IFAT på vevsavtrykk), eller
- c) isolering og identifisering av ILAV i cellekultur fra minst én prøve fra en hvilken som helst fisk på akvakultur-anlegget.

II.3. Offisiell undersøkelse og diagnostiske metoder for å utelukke eller bekrefte forekomst av ILA

Dersom det kreves at en mistanke om ILA skal bekreftes eller utelukkes i samsvar med artikkel 28 i direktiv 2006/88/EF, skal følgende framgangsmåter for kontroll, prøvetaking og testing benyttes:

- a) Den offisielle undersøkelsen skal omfatte minst én helsekontroll og én prøvetaking av ti døende fisk dersom det observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem* som er forenlige med ILA. Dersom det ikke observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem* som er forenlige med ILA, skal helsekontrollen følges av en målrettet prøvetaking av minst 30 døende fisk eller nylig død fisk med normal konstitusjon i samsvar med nr. I.1. Prøvene skal analyseres i samsvar med de diagnostiske metodene beskrevet i bokstav b).
- b) Dersom RT-qPCR gir positivt resultat med hensyn til HPR-deletert ILAV, skal ytterligere prøver analyseres før de innledende bekjempelsestiltakene fastsatt i artikkel 28 i direktiv 2006/88/EF iverksettes. En mistanke om infeksjon med ILA skal bekreftes i samsvar med følgende kriterier og ved bruk av de detaljerte metodene og framgangsmåtene som er beskrevet i del 3 i vedlegg II:
 - i) påvisning av ILAV med RT-qPCR, herunder sekvensering av HE-genet for å bekrefte HPR-delesjon, og påvisning av ILAV i vevspreparater ved hjelp av spesifikke antistoffer mot ILAV (dvs. IHK på fikserte snitt eller IFAT på vevsavtrykk)

eller

- ii) påvisning av ILAV med RT-qPCR, herunder sekvensering av HE-genet for å bekrefte HPR-delesjon, og isolering og identifisering av ILAV i cellekultur fra minst én prøve fra en hvilken som helst fisk på akvakulturanlegget.
- c) Dersom det observeres kliniske forandringer, betydelige patologiske forandringer eller gjøres histopatologiske funn som er forenlige med ILA, må funnene bekreftes ved viruspåvisning ved hjelp av to diagnostiske metoder med uavhengige påvisningsprinsipper, f.eks. RT-qPCR og IHK, i samsvar med del 3 i vedlegg II.

En mistanke om ILA kan utelukkes dersom tester og kontroller i en periode på tolv måneder fra datoen for mistanken ikke viser ytterligere tegn på forekomst av ILA.

Tabell 3.A

Overvåkingsordning for soner og segmenter for toårsperioden forut for oppnåelse av status som sykdomsfri med hensyn til ILA, som omhandlet i nr. I.2.1

| Overvåkingsår | Antall helsekontroller per år (2 år) | Antall laboratorieundersøkelser per år (2 år) | Antall fisk det skal tas prøver fra per år |
|---------------|--------------------------------------|---|--|
| År 1 | 6 | 2 ⁽¹⁾ | 2 * 75 ⁽²⁾ |
| År 2 | 6 | 2 ⁽¹⁾ | 2 * 75 ⁽²⁾ |

⁽¹⁾ Prøver skal tas og oppbevares og undersøkes i løpet av to årlige testperioder med en varighet på én måned (dvs. vår og høst), eller når det er hensiktsmessig ut fra praktiske forhold.

⁽²⁾ Høyeste antall fisk per samleprøve: 5.

Tabell 3.B

Overvåkingsordninger for soner og segmenter for å opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til ILA, som omhandlet i nr. I.3⁽²⁾

| Risikonivå | Antall helsekontroller per år | Antall laboratorieundersøkelser per år | Antall fisk det skal tas prøver fra per år |
|------------|-------------------------------|--|--|
| Høyt | 2 | 2 ⁽¹⁾ | 2 * 30 |
| Middels | 1 | 1 ⁽¹⁾ | 30 |
| Lavt | 1 hvert 2. år | 1 hvert 2. år | 30 hvert 2. år |

⁽¹⁾ Prøver skal tas og oppbevares og undersøkes i løpet av to årlige testperioder med en varighet på én måned (dvs. vår og høst), eller når det er hensiktsmessig ut fra praktiske forhold.

⁽²⁾ Skal ikke gjelde for akvakulturanlegg der det bare oppdrettes regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) eller brunørret (*Salmo trutta*) eller begge, og der vannforsyningen utelukkende er basert på ferskvannskilder som ikke huser atlantehavslaks (*Salmo salar*).

DEL 4

OVERVÅKING OG METODER TIL BEKJEMPELSE AV INFEKSJON MED *MARTEILIA REFRINGENS*

I. Krav til overvåkings- og utryddelsesprogrammer for å oppnå og opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til infeksjon med *Marteilia refringens*

I.1. Generelle krav

Helsekontroller og, dersom det er relevant, prøvetaking med henblikk på laboratorieundersøkelse skal utføres på den tiden av året da prevalensen av parasitten er kjent for å være høyest i medlemsstaten, sonen eller segmentet. Dersom slike opplysninger ikke er tilgjengelige, skal prøvetakingen utføres rett etter at vanntemperaturen har steget til over 17 °C.

Dersom det skal tas prøver av bløtdyr i samsvar med kravene omhandlet i del 4, skal følgende kriterier gjelde:

- a) Dersom *Ostrea* spp. og *Mytilus* spp. forekommer i produksjonsenhetene eller i produksjonsområdet, skal disse to slektene være likt representert i prøvene. Dersom bare én av disse slektene forekommer, skal det tas prøve av den. Dersom verken slekten *Ostrea* eller *Mytilus* forekommer, skal prøven være representativ for alle andre mottakelige arter på stedet.
- b) Dersom det i produksjonsenhetene forekommer svake bløtdyr, bløtdyr med åpne skall eller nylig døde bløtdyr, men som ikke har gått i oppløsning, skal slike bløtdyr velges i første rekke. Dersom slike bløtdyr ikke forekommer, skal de bløtdyrene som velges, omfatte de eldste friske bløtdyrene.
- c) Ved prøvetaking på akvakulturanlegg for bløtdyr der det benyttes mer enn én vannkilde til produksjon av bløtdyr, skal bløtdyr som representerer alle vannkilder, tas med i prøvetakingen på en slik måte at alle deler av akvakulturanlegget er proporsjonalt representert i prøven.
- d) Ved prøvetaking i akvakulturområder for bløtdyr skal prøven bestå av bløtdyr fra et tilstrekkelig antall prøvetakingspunkter på en slik måte at alle deler av akvakulturområdet for bløtdyr er proporsjonalt representert i prøven. De viktigste faktorene å ta hensyn til ved valg av nevnte prøvetakingspunkter er tidligere prøvetakingspunkter der det har vært påvist *Marteilia refringens*, dyretetthet, vannstrømmer, forekomst av mottakelige arter, forekomst av smittebærende arter, batymetri og driftsrutiner. Naturlige forekomster skal inngå i prøvetakingen.

I.2. Særlige krav for å oppnå helsestatus i kategori I med hensyn til *Marteilia refringens*

I.2.1. Overvåkingsprogrammer

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori III med hensyn til infeksjon med *Marteilia refringens* kan oppnå helsestatus i kategori I for denne listeførte sykdommen dersom alle akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr i medlemsstaten, sonen eller segmentet der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, har vært omfattet av minst følgende overvåkingsprogram som omfatter helsekontroller og prøvetaking.

Toårig overvåkingsprogram:

- a) Akvakulturanleggene eller akvakulturområdene for bløtdyr har vært omfattet av helsekontroller og prøvetaking i minst to påfølgende år, som fastsatt i tabell 4.A i avsnitt II.
- b) I nevnte toårsperiode må alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, ha gitt negative resultater for *Marteilia refringens*, og enhver mistanke om *Marteilia refringens* må ha blitt utelukket i samsvar med de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.3.
- c) Dersom *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* eller *Mytilus galloprovincialis* fra en medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori I skal inngå i prøven, skal de være innført på akvakulturanlegget eller i akvakulturområdet for bløtdyr senest våren rett forut for perioden for gjennomføring av overvåkingsprogrammet.

I.2.2. Utryddelsesprogrammer

I de fleste tilfeller anses det som umulig å utrydde *Marteilia refringens*, men dersom medlemsstaten vurderer dette som mulig, skal følgende modell for et utryddelsesprogram benyttes.

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V med hensyn til infeksjon med *Marteilia refringens* kan oppnå helsestatus i kategori I for denne listeførte sykdommen dersom alle akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr i nevnte medlemsstat, sone eller segment der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, har vært omfattet av minst følgende utryddelsesprogram:

- a) Tiltakene fastsatt i kapittel V avsnitt 3 i direktiv 2006/88/EF skal være gjennomført på en effektiv måte, og det skal særlig være opprettet et kontrollområde, som omhandlet i artikkel 32 bokstav b) i direktiv 2006/88/EF, som omfatter en vernesone og en overvåkingssone, rundt akvakulturanlegget/-anleggene eller akvakulturområdet/-områdene for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert med *Marteilia refringens*.

Kontrollområdet skal defineres i hvert enkelt tilfelle, idet det tas hensyn til faktorer som påvirker risikoen for spredning av *Marteilia refringens*, f.eks. antall, alder, andel og fordeling av døde bløtdyr på akvakulturanlegget eller i akvakulturområdet for bløtdyr som er infisert med *Marteilia refringens*, herunder viltlevende bløtdyr, avstand til og tetthet av nærliggende akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr, herunder viltlevende bløtdyr, nærhet til foredlingsvirksomheter, kontaknanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr, arter, særlig mottakelige arter og smittebærende arter, som forekommer på akvakulturanleggene eller i akvakulturområdene for bløtdyr, oppdrettsmetoder som benyttes på de berørte og nærliggende akvakulturanleggene og akvakulturområdene for bløtdyr, hydrodynamiske forhold og andre faktorer av epidemiologisk betydning som påvises.

Ved opprettelse av verne- og overvåkingssoner skal følgende minstekrav gjelde:

- i) Det skal opprettes en vernesone i umiddelbar nærhet av et akvakulturanlegg eller et akvakulturområde for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert med *Marteilia refringens*, som skal tilsvare et område som fastsettes i henhold til egnede hydrodynamiske eller epidemiologiske data.
- ii) Det skal opprettes en overvåkingssone utenfor vernesonen som skal tilsvare et område rundt vernesonen, som fastsettes i henhold til egnede hydrodynamiske eller epidemiologiske data.
- b) På alle akvakulturanlegg og i alle akvakulturområder for bløtdyr innenfor vernesonen der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, og som ikke offisielt er erklært som infisert med *Marteilia refringens*, skal det foretas en offisiell undersøkelse som skal omfatte minst innsamling av prøver til testing av 150 bløtdyr etter at overføringsperioden for *Marteilia refringens* har startet. Dersom overføringsperioden ikke er kjent, skal prøvetakingen starte i perioden etter at vanntemperaturen har steget til over 17 °C.
- c) Alle akvakulturanlegg og alle akvakulturområder for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert med *Marteilia refringens*, skal tømmes, brakklegges og om mulig rengjøres og desinfiseres.

Brakkleggingen skal vare i minst

- i) to måneder for akvakulturanlegg og akvakulturområder for bløtdyr med begrenset kontakt med de omkringliggende vannmassene, f.eks. klekkerier og yngelanlegg,
- ii) to måneder for akvakulturanlegg og akvakulturområder for bløtdyr med ubegrenset kontakt med de omkringliggende vannmassene, forutsatt at de infiserte bløtdyrene av mottakelige arter og bløtdyrene av mottakelige arter med epidemiologisk tilknytning til det infiserte akvakulturanlegget eller akvakulturområdet for bløtdyr er blitt høstet eller fjernet før den tiden på året når prevalensen av *Marteilia refringens* er kjent for å være høyest, eller dersom nevnte periode ikke er kjent, før vanntemperaturen overstiger 17 °C,
- iii) 14 måneder for akvakulturanlegg og akvakulturområder for bløtdyr med ubegrenset kontakt med de omkringliggende vannmassene, forutsatt at de infiserte bløtdyrene av mottakelige arter og bløtdyrene av mottakelige arter med epidemiologisk tilknytning til det infiserte akvakulturanlegget eller akvakulturområdet for bløtdyr ikke er blitt høstet eller fjernet før den tiden på året når prevalensen av *Marteilia refringens* er kjent for å være høyest, eller dersom slike data ikke er kjent, dersom bløtdyr av mottakelige arter ikke er blitt høstet eller fjernet før vanntemperaturen overstiger 17 °C.

Når alle akvakulturanlegg og akvakulturområder for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert, er tømt, skal de være brakklagt i minst fire uker samtidig.

Vedkommende myndighet kan beslutte å kreve tømming, rengjøring, desinfisering og brakklegging av andre akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr, alt etter hva som er relevant, innenfor de opprettede verne- og overvåkingssonene. Brakkleggingens varighet skal fastsettes av vedkommende myndighet etter en risikovurdering av hvert enkelt tilfelle.

- d) Alle akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert, og alle andre akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr som er blitt brakklagt innenfor de opprettede verne- og overvåkingssonene, skal kultiveringsutsettes med bløtdyr fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I med hensyn til infeksjon med *Marteilia refringens*.

Kultiveringsutsetting skal først finne sted etter at alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt i samsvar med nr. I.2.2 bokstav c).

- e) Alle akvakulturanlegg og alle akvakulturområder for bløtdyr der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, i medlemsstaten, sonen eller segmentet som omfattes av utryddelsesprogrammet, skal deretter omfattes av overvåkingsordningen omhandlet i nr. I.2.1 i denne del.

I.3. Særlige krav for å opprettholde helsestatus som sykdomsfri (kategori I) med hensyn til infeksjon med *Marteilia refringens*

Dersom det kreves målrettet overvåking for å opprettholde helsestatus i kategori I, som fastsatt i artikkel 52 i direktiv 2006/88/EF, skal det på alle akvakulturanlegg eller i alle akvakulturområder for bløtdyr der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, i den medlemsstaten, sonen eller det segmentet som er berørt, foretas helsekontroller og prøvetaking i samsvar med tabell 4.B i avsnitt II, idet det tas hensyn til akvakulturanleggets eller akvakulturområdets risiko for å bli infisert med *Marteilia refringens*.

Status som sykdomsfri kan bare opprettholdes så lenge alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, gir negative resultater for *Marteilia refringens*, og enhver mistanke om *Marteilia refringens* er blitt utelukket i samsvar med de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.3.

I.4. Krav for å oppheve tiltak mot spredning av sykdom fastsatt i artikkel 39 i direktiv 2006/88/EF (endring av helsestatus fra kategori V til kategori III) med hensyn til infeksjon med *Marteilia refringens*

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V med hensyn til infeksjon med *Marteilia refringens* kan oppnå helsestatus i kategori III for denne listeførte sykdommen, forutsatt at

- a) kravene fastsatt i nr. I.2.2 bokstav a), b) og c) er oppfylt; dersom brakklagging ikke er teknisk mulig, skal akvakulturanleggene omfattes av et alternativt tiltak som gir nesten samme garanti for at *Marteilia refringens* er utryddet i akvakulturanleggets omgivelser,
- b) alle akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert, og alle andre akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr som er blitt brakklagt / omfattet av alternative tiltak i samsvar med bokstav a) i de opprettede verne- og overvåkingssonene, er blitt kultiveringsutsatt med bløtdyr fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I, II eller III med hensyn til infeksjon med *Marteilia refringens*,
- c) kultiveringsutsettingen først har funnet sted etter at alle akvakulturanlegg eller alle akvakulturområder for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert, er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt eller omfattet av alternative tiltak i samsvar med bokstav a),
- d) det ikke har vært bekreftet forekomst av infeksjon med *Marteilia refringens* i den toårsperioden som følger etter gjennomføring av tiltakene omhandlet i bokstav a), b) og c), og mistankene i denne perioden er blitt utelukket i samsvar med framgangsmåtene beskrevet i nr. II.3.

II. Diagnostiske metoder og offisielle undersøkelser

II.1. Prøver

Hele dyret skal sendes til laboratoriet med henblikk på de diagnostiske testene som er beskrevet i nr. II.2 og II.3.

II.2. Diagnostiske metoder for å oppnå eller opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til infeksjon med *Marteilia refringens*

De diagnostiske metodene som skal benyttes for å oppnå eller opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til infeksjon med *Marteilia refringens* i samsvar med de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene som er beskrevet i del 4 i vedlegg II, skal være histopatologi, vevsavtrykk eller PCR.

II.3. Offisiell undersøkelse og diagnostiske metoder for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om infeksjon med *Marteilia refringens*

Dersom det kreves at en mistanke om infeksjon med *Marteilia refringens* skal bekreftes eller utelukkes i samsvar med artikkel 28 i direktiv 2006/88/EF, skal følgende framgangsmåter for kontroll, prøvetaking og testing benyttes:

- a) Den offisielle undersøkelsen skal omfatte minst én prøvetaking av 30 bløtdyr av mottakelige arter dersom mistanken bygger på en dødelighetsrapport, eller dersom dette ikke er tilfellet, av 150 bløtdyr av mottakelige arter etter at overføringsperioden for *Marteilia refringens* har startet. Dersom overføringsperioden ikke er kjent, skal prøvetakingen starte i perioden etter at vanntemperaturen har steget til over 17 °C.
- b) Prøvene skal analyseres ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i punkt i), i samsvar med de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene som er beskrevet i del 4 avsnitt I i vedlegg II.
 - i) Forekomst av *Marteilia refringens* skal anses som bekreftet dersom et positivt resultat oppnådd ved hjelp av histopatologi, vevsavtrykk eller in situ-hybridisering kombineres med et positivt resultat oppnådd med PCR etterfulgt av sekvensering.
 - ii) En mistanke om infeksjon med *Marteilia refringens* kan utelukkes dersom testene omhandlet i punkt i) ikke viser ytterligere tegn på forekomst av *Marteilia refringens*.

Tabell 4.A

Overvåkingsordning for medlemsstater, soner eller segmenter for kontrollperioden forut for oppnåelse av status som sykdomsfri med hensyn til *Marteilia refringens*, som omhandlet i nr. I.2.1

| | Antall helsekontroller per år | Antall laboratorieundersøkelser per år | Antall bløtdyr i prøven |
|--|-------------------------------|--|-------------------------|
| Akvakulturanlegg / akvakulturområder for bløtdyr | 1 | 1 | 150 |

Tabell 4.B

Overvåkingsordninger for medlemsstater, soner eller segmenter for å opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til *Marteilia refringens*, som omhandlet i nr. I.3

| Risikonivå | Antall helsekontroller | Antall laboratorieundersøkelser | Antall bløtdyr i prøven |
|------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Høyt | 1 per år | 1 hvert 2. år | 150 |
| Middels | 1 hvert 2. år | 1 hvert 2. år | 150 |
| Lavt | 1 hvert 2. år | 1 hvert 4. år | 150 |

DEL 5

OVERVÅKING OG METODER TIL BEKJEMPELSE AV INFEKSJON MED *BONAMIA OSTREAE*

I. Krav til overvåkings- eller utryddelsesprogrammer for å oppnå og opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til infeksjon med *Bonamia ostreae*

I.1. Generelle krav

Helsekontroller og, dersom det er relevant, prøvetaking av produksjonsenheter skal utføres på den tiden av året da prevalensen av *Bonamia ostreae* er kjent for å være høyest i medlemsstaten, sonen eller segmentet. Dersom slike opplysninger ikke er tilgjengelige, skal prøvetakingen foretas om vinteren eller i begynnelsen av våren.

Dersom det skal tas prøver av bløtdyr i samsvar med kravene omhandlet i del 5, skal følgende kriterier gjelde:

- a) Dersom *Ostrea edulis* forekommer, er det bare østers av denne arten som skal velges for prøvetaking. Dersom *Ostrea edulis* ikke forekommer, skal prøven være representativ for alle andre mottakelige arter på stedet.
- b) Dersom det forekommer svake bløtdyr, bløtdyr med åpne skall eller nylig døde bløtdyr, men som ikke har gått i oppløsning, skal slike bløtdyr velges i første rekke. Dersom slike bløtdyr ikke forekommer, skal de bløtdyrene som velges, omfatte de eldste friske bløtdyrene.
- c) Ved prøvetaking på akvakulturanlegg der det benyttes mer enn én vannkilde til produksjon av bløtdyr, skal bløtdyr som representerer alle vannkilder, tas med i prøvetakingen på en slik måte at alle deler av akvakulturanlegget er proporsjonalt representert i prøven.
- d) Ved prøvetaking i akvakulturområder for bløtdyr skal bløtdyr fra et tilstrekkelig antall prøvetakingspunkter inngå i prøven. De viktigste faktorene å ta hensyn til ved valg av nevnte prøvetakingspunkter er tidligere prøvetakingspunkter der det har vært påvist *Bonamia ostreae*, dyretetthet, vannstrømmer, forekomst av mottakelige arter, forekomst av smittebærende arter, batymetri og driftsrutiner. Naturlige forekomster i eller tilstøtende til akvakulturområdene skal inngå i prøvetakingen.

I.2. Særlige krav for å oppnå helsestatus i kategori I med hensyn til *Bonamia ostreae*

I.2.1. Overvåkingsprogrammer

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori III med hensyn til *Bonamia ostreae* kan oppnå helsestatus i kategori I igjen for denne listeførte sykdommen dersom alle akvakulturanlegg i medlemsstaten, sonen eller segmentet der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, har vært omfattet av minst følgende overvåkingsprogram som omfatter helsekontroller og prøvetaking.

Toårig overvåkingsprogram:

- a) Akvakulturanleggene eller akvakulturområdene for bløtdyr der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, har vært omfattet av helsekontroller og prøvetaking i minst to påfølgende år, som fastsatt i tabell 5.A i denne del.
- b) I nevnte toårsperiode må alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, ha gitt negative resultater for *Bonamia ostreae*, og enhver mistanke om *Bonamia ostreae* må ha blitt utelukket i samsvar med de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.3.
- c) Dersom *Ostrea edulis* fra en medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori I skal inngå i prøven, skal dette være innført på akvakulturanlegget eller i akvakulturområdet for bløtdyr senest høsten rett forut for perioden for gjennomføring av overvåkingsprogrammet.

I.2.2. Utryddelsesprogrammer

I de fleste tilfeller anses det som umulig å utrydde *Bonamia ostreae*, men dersom medlemsstaten vurderer dette som mulig, skal følgende modell for et utryddelsesprogram benyttes.

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V med hensyn til *Bonamia ostreae* kan oppnå helsestatus i kategori I igjen for denne listeførte sykdommen dersom alle akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr i medlemsstaten, sonen eller segmentet der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, har vært omfattet av minst følgende utryddelsesprogram:

- a) Minstetiltakene for bekjempelse fastsatt i kapittel V avsnitt 3 i direktiv 2006/88/EF skal være gjennomført på en effektiv måte, og det skal særlig være opprettet et kontrollområde, som omhandlet i artikkel 32 bokstav b) i nevnte direktiv, som omfatter en vernesone og en overvåkingssone, rundt akvakulturanlegget/-anleggene eller akvakulturområdet/-områdene for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert med *Bonamia ostreae*.

Kontrollområdet skal defineres i hvert enkelt tilfelle, idet det tas hensyn til faktorer som påvirker risikoen for spredning av nevnte listeførte sykdom, f.eks. antall, andel, alder og fordeling av døde bløtdyr på akvakulturanlegget eller i akvakulturområdet for bløtdyr infisert med *Bonamia ostreae*, herunder viltlevende bløtdyr, avstand til og tetthet av nærliggende akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr, herunder viltlevende bløtdyr, nærhet til foredlingsevirkosheter, kontaknanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr, arter som forekommer på akvakulturanleggene eller i akvakulturområdene for bløtdyr, særlig mottakelige arter og smittebærende arter, oppdrettsmetoder som benyttes på de berørte og nærliggende akvakulturanleggene eller i akvakulturområdene for bløtdyr, hydrodynamiske forhold og andre faktorer av epidemiologisk betydning som påvises.

Ved opprettelse av verne- og overvåkingssoner skal følgende minstekrav gjelde:

- i) Det skal opprettes en vernesone i umiddelbar nærhet av et akvakulturanlegg eller et akvakulturområde for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert med *Bonamia ostreae*, som skal tilsvare et område som fastsettes i henhold til egnede hydrodynamiske eller epidemiologiske data.
- ii) Det skal opprettes en overvåkingssone utenfor vernesonen som skal tilsvare et område rundt vernesonen, som fastsettes i henhold til egnede hydrodynamiske eller epidemiologiske data.
- b) På alle akvakulturanlegg og i alle akvakulturområder for bløtdyr innenfor vernesonen der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, og som ikke offisielt er erklært som infisert med *Bonamia ostreae*, skal det foretas en offisiell undersøkelse som skal omfatte minst innsamling av prøver til testing av 150 bløtdyr av mottakelige arter, etter at overføringsperioden for *Bonamia ostreae* har startet. Dersom overføringsperioden ikke er kjent, skal prøvetakingen starte om vinteren eller i begynnelsen av våren.
- c) Alle akvakulturanlegg og alle akvakulturområder for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert med *Bonamia ostreae*, skal tømmes, brakklegges og om mulig rengjøres og desinfiseres. Brakkleggingen skal vare i minst seks måneder.

Når alle akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert, er tømt, skal de være brakklagt i minst fire uker samtidig.

Vedkommende myndighet kan beslutte å kreve tømming, rengjøring, desinfisering og brakklegging av andre akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr, alt etter hva som er relevant, innenfor de opprettede verne- og overvåkingssonene. Brakkleggingens varighet skal fastsettes av vedkommende myndighet etter en risikovurdering av hvert enkelt tilfelle.

- d) Alle akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert, og alle andre akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr som er blitt brakklagt innenfor de opprettede verne- og overvåkingssonene, skal kultiveringsutsettes med bløtdyr fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I med hensyn til infeksjon med *Bonamia ostreae*. Kultiveringsutsetting skal først finne sted etter at alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt i samsvar med nr. I.2.2 bokstav c).
- e) Alle akvakulturanlegg og alle akvakulturområder for bløtdyr der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, i medlemsstaten, sonen eller segmentet som omfattes av utryddelsesprogrammet, skal deretter omfattes av overvåkingsprogrammet fastsatt i nr. I.2.

I.3. Særlige krav for å opprettholde helsestatus som sykdomsfri (kategori I) med hensyn til infeksjon med *Bonamia ostreae*

Dersom det kreves målrettet overvåking for å opprettholde helsestatus i kategori I, som fastsatt i artikkel 52 i direktiv 2006/88/EF, skal det på alle akvakulturanlegg eller i alle akvakulturområder for bløtdyr der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til nevnte direktiv, i den medlemsstaten, sonen eller det segmentet som er berørt, foretas helsekontroller og prøvetaking i samsvar med tabell 5.B i avsnitt II i denne del, idet det tas hensyn til akvakulturanleggets eller akvakulturområdets risiko for å bli infisert med *Bonamia ostreae*.

Status som sykdomsfri med hensyn til infeksjon med *Bonamia ostreae* kan bare opprettholdes så lenge alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, har gitt negative resultater for *Bonamia ostreae*, og enhver mistanke om *Bonamia ostreae* er blitt utelukket i samsvar med de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.3.

- I.4. Krav for å oppheve tiltak mot spredning av sykdom fastsatt i artikkel 39 i direktiv 2006/88/EF (endring av helsestatus fra kategori V til kategori III) med hensyn til infeksjon med *Bonamia ostreae*

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V med hensyn til infeksjon med *Bonamia ostreae* kan oppnå helsestatus i kategori III for nevnte sykdom, forutsatt at

- a) kravene fastsatt i nr. I.2.2 bokstav a), b) og c) er oppfylt. Dersom brakklegging ikke er teknisk mulig, skal akvakulturanleggene omfattes av et alternativt tiltak som gir nesten samme garanti for at *Bonamia ostreae* er utryddet i akvakulturanleggets omgivelser,
- b) alle akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert, og alle andre akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr som er blitt brakklagt / omfattet av alternative tiltak i samsvar med bokstav a) i de opprettede verne- og overvåkingssonene, er blitt kultiveringsutsatt med bløtdyr fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I, II eller III med hensyn til infeksjon med *Bonamia ostreae*,
- c) kultiveringsutsettingen først har funnet sted etter at alle akvakulturanlegg eller alle akvakulturområder for bløtdyr som offisielt er erklært som infisert, er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt / omfattet av alternative tiltak i samsvar med bokstav a),
- d) det ikke har vært bekreftet forekomst av infeksjon med *Bonamia ostreae* i den toårsperioden som følger etter gjennomføring av tiltakene omhandlet i bokstav a), b) og c), og mistankene i denne perioden er blitt utelukket i samsvar med framgangsmåtene beskrevet i nr. II.3.

II. Diagnostiske metoder og kriterier

II.1. Prøver

Hele dyret skal sendes til laboratoriet med henblikk på de diagnostiske testene som er beskrevet i nr. II.2 og II.3.

II.2. Diagnostiske metoder for å oppnå eller opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til infeksjon med *Bonamia ostreae*

De diagnostiske metodene som skal benyttes for å oppnå eller opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til infeksjon med *Bonamia ostreae*, skal være histopatologi, vevsavtrykk eller PCR. Når nevnte diagnostiske metoder benyttes, skal de detaljerte metodene og framgangsmåtene beskrevet i del 5 i vedlegg II følges.

II.3. Diagnostiske kriterier for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om infeksjon med *Bonamia ostreae*

Dersom det kreves at en mistanke om infeksjon med *Bonamia ostreae* skal bekrefte eller utelukkes i samsvar med artikkel 28 i direktiv 2006/88/EF, skal følgende framgangsmåter for kontroll, prøvetaking og testing benyttes:

Den offisielle undersøkelsen skal omfatte minst én prøvetaking av 30 bløtdyr av mottakelige arter dersom mistanken bygger på en dødelighetsrapport, eller dersom dette ikke er tilfellet, av 150 bløtdyr av mottakelige arter etter at overføringsperioden for *Bonamia ostreae* har startet. Dersom overføringsperioden ikke er kjent, skal prøvetakingen starte om vinteren eller i begynnelsen av våren. Prøvene skal analyseres ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i punkt i), i samsvar med de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene som er beskrevet i del 5 avsnitt I i vedlegg II.

- i) Forekomst av *Bonamia ostreae* skal anses som bekreftet dersom et positivt resultat oppnådd ved hjelp av histopatologi, vevsavtrykk eller in situ-hybridisering kombineres med et positivt resultat oppnådd med PCR etterfulgt av sekvensering, i samsvar med de godkjente metodene og framgangsmåtene som er beskrevet i del 5 i vedlegg II.
- ii) En mistanke om forekomst av infeksjon med *Bonamia ostreae* skal anses som utelukket dersom nevnte tester ikke viser ytterligere tegn på forekomst av *Bonamia ostreae*.

Tabell 5.A

Overvåkingsordning for medlemsstater, soner eller segmenter for kontrollperioden forut for oppnåelse av status som sykdomsfri med hensyn til *Bonamia ostreae*, som omhandlet i nr. I.2.1

| | Antall helsekontroller per år | Antall laboratorieundersøkelser per år | Antall bløtdyr i prøven |
|--|-------------------------------|--|-------------------------|
| Akvakulturanlegg / akvakulturområder for bløtdyr | 1 | 1 | 150 |

Tabell 5.B

Overvåkingsordninger for medlemsstater, soner eller segmenter for å opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til *Bonamia ostreae*, som omhandlet i nr. I.3

| Risikonivå | Antall helsekontroller | Antall laboratorieundersøkelser | Antall bløtdyr i prøven |
|------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Høyt | 1 per år | 1 hvert 2. år | 150 |
| Middels | 1 hvert 2. år | 1 hvert 2. år | 150 |
| Lavt | 1 hvert 2. år | 1 hvert 4. år | 150 |

DEL 6

OVERVÅKING OG METODER TIL BEKJEMPELSE AV HVITFLEKKSYKDOM (WSD)

I. Krav til overvåkings- og utryddelsesprogrammer for å oppnå og opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til WSD, samt for å hindre spredning av infeksjon med WSSV

I.1. Generelle krav til kontroller og prøvetaking

Det skal tas prøver av krepsdyr med henblikk på laboratorieundersøkelse på den tiden av året da vanntemperaturen forventes å være høyest. Nevnte krav til vanntemperatur skal også gjelde for helsekontroller dersom disse er mulige å gjennomføre og relevante.

Dersom det skal tas prøver av oppdrettskrepsdyr i samsvar med kravene fastsatt i denne del, skal følgende kriterier gjelde:

- a) Dersom det forekommer svake eller døende krepsdyr i produksjonsenhetene, skal slike krepsdyr velges i første rekke. Dersom det ikke forekommer slike krepsdyr, skal de utvalgte krepsdyrene stamme fra forskjellige størrelseskohorter, dvs. yngel og voksne individer, av de utvalgte mottakelige artene, som skal være proporsjonalt representert i prøven.
- b) Dersom det benyttes mer enn én vannkilde til krepsdyrproduksjon, skal mottakelige krepsdyr fra alle vannkilder inngå i prøvetakingen.

Dersom det kreves målrettet overvåking av viltlevende bestander i samsvar med del I nr. 2 annet ledd i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF, skal antallet og den geografiske spredningen av prøvetakingspunkter fastsettes slik at det oppnås en rimelig dekning av medlemsstaten, sonen eller segmentet. Prøvetakingspunktene skal også være representative for de forskjellige økosystemene der de viltlevende bestandene av mottakelige arter finnes, dvs. hav-, elvemunnings-, elve- og innsjøsystemer.

Dersom det kreves målrettet overvåking av viltlevende bestander i samsvar med del I nr. 2 annet ledd i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF, skal krepsdyrene som omfattes av prøvetakingen, velges på følgende måte:

- i) I områder med hav- og elvemunningssystemer skal én eller flere av følgende arter velges: *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus*, *Eriocheir sinensis*, *Liocarcinus depurator*, *Liocarcinus puber*, *Crangon crangon*, *Homarus gammarus*, *Palaemon adspersus* eller reker i Penaeidae-familien, dvs. *Penaeus japonicus*, *Penaeus kerathurus*, *Penaeus semisulcatus*. Dersom nevnte arter ikke forekommer, skal prøven være representativ for andre mottakelige arter i Decapoda-ordenen på stedet. Med tanke på det store antallet mottakelige vertarter kan verter velges fra slekter eller familier i Decapoda-ordenen dersom mottakelighet er blitt påvist ved forsøk eller naturlig.
- ii) I elve- og innsjøsystemer skal én eller flere av følgende arter velges: *Pacifastacus leniusculus*, *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes* eller *Orconectes limosus*. Dersom nevnte arter ikke forekommer, skal prøven være representativ for andre mottakelige arter i Decapoda-ordenen på stedet. Med tanke på det store antallet mottakelige vertarter kan verter velges fra slekter eller familier i Decapoda-ordenen dersom mottakelighet er blitt påvist ved forsøk eller naturlig.
- iii) Dersom det forekommer svake eller døende krepsdyr, skal slike krepsdyr velges i første rekke. Dersom det ikke forekommer slike krepsdyr, skal de utvalgte krepsdyrene stamme fra forskjellige størrelseskohorter, dvs. yngel og voksne individer, av de utvalgte mottakelige artene, som skal være proporsjonalt representert i prøven.

I.2. Særlige krav for å oppnå helsestatus i kategori I med hensyn til WSD

I.2.1. Overvåkingsprogrammer

- a) En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori III med hensyn til WSD i samsvar med del B i vedlegg III til direktiv 2006/88/EF kan oppnå helsestatus i kategori I for denne listeførte sykdommen dersom alle akvakulturanlegg i medlemsstaten, sonen eller segmentet der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til nevnte direktiv, oppfyller de relevante kravene som er fastsatt i vedlegg V til nevnte direktiv, og alle disse akvakulturanleggene og, dersom det kreves i henhold til del I nr. 2 annet ledd i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF, prøvetakingspunktene i viltlevende bestander utvalgt i samsvar med nevnte nummer har vært omfattet av følgende toårige overvåkingsprogram som omfatter helsekontroller og prøvetaking.

Akvakulturanleggene eller prøvetakingspunktene har vært omfattet av helsekontroller og prøvetaking i minst to påfølgende år, som fastsatt i tabell 6.A i avsnitt II.

I nevnte toårsperiode må alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.2, ha gitt negative resultater for infeksjon med WSD, og enhver mistanke om WSD må ha blitt utelukket i samsvar med de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.3.

- b) Dersom det i forbindelse med gjennomføringen av overvåkingsprogrammet omhandlet i bokstav a) bekrefte infeksjon med WSSV på et akvakulturanlegg som omfattes av nevnte overvåkingsprogram, og anleggets helsestatus i kategori II derfor er blitt trukket tilbake, kan akvakulturanlegget få tilbake sin helsestatus i kategori II umiddelbart og fortsette gjennomføringen av overvåkingsprogrammet for å oppnå status som sykdomsfri uten å gjennomføre et utryddelsesprogram, som omhandlet i nr. I.2.2, forutsatt at
 - i) det er et fastlandsanlegg hvis helsestatus for WSD er uavhengig av helsestatusen med hensyn til denne listeførte sykdommen i de omkringliggende naturlige vannmassene i samsvar med del II nr. 3 i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF,
 - ii) anlegget er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt; brakklaggingen skal vare i minst seks uker,
 - iii) det er blitt kultiveringsutsatt med krepsdyr fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I med hensyn til WSD.

I.2.2. Utryddelsesprogrammer

I.2.2.1. Generelle krav

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V med hensyn til WSD kan oppnå helsestatus i kategori I for denne listeførte sykdommen dersom alle akvakulturanlegg i nevnte medlemsstat, sone eller segment der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, har vært omfattet av minst følgende utryddelsesprogram:

- a) Minstetiltakene for bekjempelse fastsatt i kapittel V avsnitt 4 i direktiv 2006/88/EF skal være gjennomført på en effektiv måte, og det skal være opprettet et kontrollområde, som omhandlet i artikkel 32 bokstav b) i nevnte direktiv, som omfatter en vernesone og en overvåkingssone, rundt akvakulturanlegget/-anleggene som offisielt er erklært som infisert med WSD.

Kontrollområdet skal defineres i hvert enkelt tilfelle, idet det tas hensyn til faktorer som påvirker risikoen for spredning av WSD til oppdrettskrepssdyr og viltlevende krepssdyr, f.eks. antall, andel og fordeling av døde krepssdyr på det akvakulturanlegget som er infisert med WSD, avstand til og tetthet av nærliggende akvakulturanlegg, kontaknanlegg, arter som forekommer på akvakulturanleggene, oppdrettsmetoder som benyttes på de berørte og nærliggende akvakulturanleggene, hydrodynamiske forhold og andre faktorer av epidemiologisk betydning som påvises.

Ved opprettelse av verne- og overvåkingssoner skal følgende minstekrav gjelde:

- i) Det skal opprettes en vernesone i umiddelbar nærhet av et akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med WSD, som skal tilsvare følgende:
 - 1) I hav- og elvemunningsområder: et område innenfor en sirkel med en radius på minst én tidevannsbevegelse eller minst 5 km, alt etter hva som er størst, med sentrum på det akvakulturanlegget som offisielt er erklært som infisert med WSD, eller et tilsvarende område fastsatt i henhold til egnede hydrodynamiske eller epidemiologiske data.
 - 2) I ferskvann: hele nedbørfeltet for det akvakulturanlegget som offisielt er erklært som infisert med WSD. Vedkommende myndighet kan begrense vernesonens utstrekning til deler av nedbørfeltet, forutsatt at dette ikke svekker tiltakene for å hindre spredning av WSD.
- ii) Det skal opprettes en overvåkingssone utenfor vernesonen som skal tilsvare følgende:
 - 1) I havområder: et område rundt vernesonen der sonene for tidevannsbevegelsen overlapper vernesonen, eller et område rundt vernesonen innenfor en sirkel med en radius på 10 km fra sentrum av vernesonen, eller et tilsvarende område fastsatt i henhold til egnede hydrodynamiske eller epidemiologiske data.
 - 2) I ferskvann: et utvidet område utenfor den opprettede vernesonen.
- b) På alle akvakulturanlegg innenfor vernesonen der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, og som ikke offisielt er erklært som infisert med WSD, skal det foretas en offisiell undersøkelse som skal omfatte minst følgende elementer:
 - i) Innsamling av prøver til testing av ti krepssdyr dersom det observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem* som er forenlige med WSD, eller 150 krepssdyr dersom det ikke observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem*.
 - ii) Én helsekontroll: På de akvakulturanleggene der testene omhandlet i punkt i) har gitt negative resultater, skal helsekontrollene fortsette én gang i måneden på den tiden av året da det er sannsynlig at vanntemperaturen vil være høyest, fram til vernesonen oppheves i samsvar med nr. I.2.2.1 bokstav c).

- c) Alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med WSD, skal tømmes, rengjøres, desinfiseres og brakklegges. Brakkleggingen skal vare i minst seks uker. Når alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, er tømt, skal de være brakklagt i minst tre uker samtidig. Dette ledd får også anvendelse på nye akvakulturanlegg som offisielt erklæres som infisert i forbindelse med gjennomføringen av utryddelsesprogrammet.

Når akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, brakklegges, skal vernesonene omgjøres til overvåkingssoner.

Vedkommende myndighet kan beslutte å kreve tømming, rengjøring, desinfisering og brakklegging av andre akvakulturanlegg innenfor de opprettede verne- og overvåkingssonene. Brakkleggingens varighet skal fastsettes av vedkommende myndighet etter en risikovurdering av hvert enkelt tilfelle.

- d) Alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert, og alle andre akvakulturanlegg som er blitt brakklagt i de opprettede verne- og overvåkingssonene, skal kultiveringsutsettes
- i) med krepsdyr fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I med hensyn til WSD, eller
 - ii) i en overgangsperiode fram til 31. desember 2020, med krepsdyr fra medlemsstater, soner eller segmenter med et godkjent program for overvåking av WSD.

Kultiveringsutsetting skal først finne sted etter at alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med WSD, er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt i samsvar med nr. I.2.2.1 bokstav c).

- e) På alle akvakulturanlegg der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF, i medlemsstaten, sonen eller segmentet som omfattes av utryddelsesprogrammet, og dersom det kreves overvåking av villlevende bestander, skal de prøvetakingspunktene som er utvalgt i samsvar med del I nr. 2 annet ledd i vedlegg V til nevnte direktiv, omfattes av minst det programmet som er fastsatt i nr. I.2.1.

I.2.2.2. Krav for å få tilbake status som sykdomsfri med hensyn til WSD for fastlandssegmenter som omfatter ett enkelt akvakulturanlegg som tidligere er blitt erklært fritt for WSD

Et fastlandssegment som omfatter ett enkelt akvakulturanlegg med helsestatus i kategori I med hensyn til WSD, hvis helsestatus for denne listeførte sykdommen er uavhengig av de omkringliggende naturlige vannmassene i samsvar med del II nr. 3 i vedlegg V til direktiv 2006/88/EF, og hvis status i kategori I er blitt trukket tilbake i samsvar med artikkel 53 nr. 3 i nevnte direktiv, kan få tilbake sin helsestatus i kategori I umiddelbart etter at vedkommende myndighet har bekreftet at følgende vilkår er oppfylt:

- a) Akvakulturanlegget med WSD er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt. Brakkleggingen skal ha vart i minst seks uker.
- b) Akvakulturanlegget med WSD er blitt kultiveringsutsatt med krepsdyr fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I med hensyn til WSD.

I.3. Særlige krav for å opprettholde helsestatus som sykdomsfri (kategori I) med hensyn til WSD

Dersom det kreves målrettet overvåking for å opprettholde helsestatus i kategori I, som fastsatt i artikkel 52 i direktiv 2006/88/EF, skal det på alle akvakulturanlegg der det holdes mottakelige arter oppført i del II i vedlegg IV til nevnte direktiv, i den medlemsstaten, sonen eller det segmentet som er berørt, foretas en helsekontroll og prøvetaking i samsvar med tabell 6 B i avsnitt II, idet det tas hensyn til akvakulturanleggets risiko for å bli infisert med WSD.

I medlemsstater, soner eller segmenter der antall akvakulturanlegg er begrenset og målrettet overvåking av disse anleggene ikke frambringer tilstrekkelige epidemiologiske data, skal overvåkingssystemene for å opprettholde status som sykdomsfri omfatte de prøvetakingspunktene som er utvalgt i samsvar med kravene fastsatt i nr. I.1.

Nevnte prøvetakingspunkter skal omfattes av kontroller og prøvetaking i henhold til en rotasjonsordning (50 % av prøvetakingspunktene hvert år). Prøvetakingen skal utføres i samsvar med tabell 6 B i avsnitt II. Prøvene skal velges ut, tillages og undersøkes i samsvar med de diagnostiske metodene og prøvetakingsmetodene som er beskrevet i avsnitt II, og laboratorieundersøkelsene må ha gitt negative resultater med hensyn til WSD-agens.

Status som sykdomsfri skal bare opprettholdes så lenge alle prøver analysert ved bruk av de diagnostiske metodene og prøvetakingsmetodene som er beskrevet i nr. II.2, gir negative resultater for WSD, og enhver mistanke om WSD er blitt utelukket i samsvar med den offisielle undersøkelsen og de diagnostiske metodene som er beskrevet i nr. II.3.

I.4. Krav for å oppheve tiltak mot spredning av sykdom fastsatt i artikkel 39 i direktiv 2006/88/EF (endring av helsestatus fra kategori V til kategori III) med hensyn til WSD

En medlemsstat, en sone eller et segment med helsestatus i kategori V med hensyn til WSD kan oppnå helsestatus i kategori III for denne listeførte sykdommen, forutsatt at

- a) kravene fastsatt i nr. I.2.2.1 bokstav a), b) og c) er oppfylt; dersom brakklegging ikke er teknisk mulig, skal akvakulturanleggene omfattes av et alternativt tiltak som gir nesten samme garanti for at WSSV er utryddet i akvakulturanleggets omgivelser,
- b) alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med WSD, og alle andre akvakulturanlegg som er blitt brakklagt / omfattet av alternative tiltak i samsvar med bokstav a) i de opprettede verne- og overvåkingssonene, er blitt kultiveringsutsatt med krepsdyr fra medlemsstater, soner eller segmenter med helsestatus i kategori I, II eller III med hensyn til WSD,
- c) kultiveringsutsettingen først har funnet sted etter at alle akvakulturanlegg som offisielt er erklært som infisert med WSD, er blitt tømt, rengjort, desinfisert og brakklagt / omfattet av alternative tiltak i samsvar med bokstav a),
- d) det ikke har vært påvist WSD i den toårsperioden som følger etter gjennomføring av tiltakene omhandlet i bokstav a) og b), og mistankene i denne perioden er blitt utelukket i samsvar med framgangsmåtene beskrevet i nr. II.3.

II. Diagnostiske metoder og prøvetakingsmetoder

II.1. Prøver

Prøver av epidermis (integument), enten dissekert eller i det undersøkte dyrets gangbein, pleopoder, munddel eller gjeller, skal fikseres i 95 % etanol før tillaging av prøvene med henblikk på totrinns PCR.

Andre prøver, som fikseres med henblikk på histologi og transmisjonselektronmikroskopi, kan tas for å støtte de diagnostiske dataene som oppnås med PCR.

II.2. Diagnostiske metoder for å oppnå eller opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til WSD

Den diagnostiske metoden som skal benyttes for å oppnå eller opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til WSD i samsvar med de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene som er beskrevet i del 6 i vedlegg II, skal være totrinns PCR.

Dersom totrinns PCR gir positivt resultat, skal resultatet bekreftes ved sekvensering av amplikonet før de innledende bekjempelsestiltakene fastsatt i artikkel 28 i direktiv 2006/88/EF gjennomføres, dersom det er praktisk mulig, ved påvisning av patognomoniske tegn på WSD i de utvalgte mottakelige vertene ved hjelp av histologi og transmisjonselektronmikroskopi.

II.3. Offisiell undersøkelse og diagnostiske metoder for å utelukke mistanke om eller bekrefte forekomst av infeksjon med WSD

Dersom det kreves at infeksjon med WSD skal bekreftes eller at en mistanke om denne infeksjonen skal utelukkes i samsvar med artikkel 28 i direktiv 2006/88/EF, skal følgende framgangsmåter for kontroll, prøvetaking og testing benyttes:

- a) Den offisielle undersøkelsen skal omfatte minst én helsekontroll og én prøvetaking av ti krepsdyr dersom det observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem* som er forenlige med infeksjon med WSD, eller 150 krepsdyr dersom det ikke observeres kliniske tegn eller tegn *post mortem*. Prøvene skal analyseres ved hjelp av den diagnostiske metoden som er beskrevet i nr. II.2 (totrinns PCR).

- b) Forekomst av WSD skal anses som bekreftet når totrinns PCR etterfulgt av sekvensering i samsvar med de detaljerte metodene og framgangsmåtene som er beskrevet i del 6 i vedlegg II, viser positivt resultat for WSSV, og når det forekommer patognomoniske tegn på WSD i de utvalgte vertene.

En mistanke om WSD kan utelukkes dersom nevnte tester ikke viser ytterligere tegn på forekomst av WSD.

Tabell 6 A

Overvåkingsordning for medlemsstater, soner og segmenter for toårsperioden forut for oppnåelse av status som sykdomsfri med hensyn til WSD, som omhandlet i nr. I.2.1

| | Antall kliniske kontroller per år | Antall laboratorieundersøkelser per år | Antall krepsdyr i prøven |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--|--------------------------|
| Akvakulturanlegg/prøvetakingssteder | 1 | 1 | 150 |

Tabell 6 B

Overvåkingsordninger for medlemsstater, soner eller segmenter for å opprettholde status som sykdomsfri med hensyn til WSD, som omhandlet i nr. I.3

| Risikonivå | Antall helsekontroller | Antall laboratorieundersøkelser | Antall krepsdyr i prøven |
|------------|------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Høyt | 1 per år | 1 hvert 2. år | 150 |
| Middels | 1 hvert 2. år | 1 hvert 2. år | 150 |
| Lavt | 1 hvert 2. år | 1 hvert 4. år | 150 |

VEDLEGG II

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER

I. Innledning

I dette vedlegg fastsettes detaljerte framgangsmåter for de diagnostiske metodene som skal benyttes i forbindelse med laboratorieundersøkelsene i utryddelses- og overvåkingsprogrammene omhandlet i vedlegg I til denne beslutning, samt for å bekrefte eller utelukke mistanke om forekomst av følgende ikke-eksotiske sykdommer oppført i del II i vedlegg IV til direktiv 2006/88/EF («listeførte sykdommer»), i samsvar med artikkel 57 bokstav b) i nevnte direktiv:

| | | |
|----|---|-------|
| 1. | Hemoragisk virusseptikemi (VHS) | Del 1 |
| 2. | Infeksiøs hematopoietisk nekrose (IHN) | Del 1 |
| 3. | Koiherpesvirus sykdom (KHVD) | Del 2 |
| 4. | Infeksiøs lakseanemi (ILA) | Del 3 |
| 5. | Infeksjon med <i>Marteilia refringens</i> | Del 4 |
| 6. | Infeksjon med <i>Bonamia ostreae</i> | Del 5 |
| 7. | Hvitflekk sykdom (WSD) | Del 6 |

II. Definisjoner

I dette vedlegg menes med «transportmedium» et cellekulturmedium med 10 % kalveserum og med 200 IE penicillin, 200 µg streptomycin og 200 µg kanamycin per milliliter, eller med andre antibiotika med dokumentert virkning.

DEL 1

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER FOR OVERVÅKING OG BEKREFTELSE AV IHN OG VHS

I. Diagnostiske metoder og framgangsmåter for overvåking av VHS og IHN

Når det utføres prøvetaking og laboratorieundersøkelse for å oppnå eller opprettholde helsestatus som sykdomsfri med hensyn til IHN eller VHS, som omhandlet i del 1 avsnitt I i vedlegg I, ved bruk av de diagnostiske metodene beskrevet i del 1 nr. II.1 og II.2 i nevnte vedlegg, skal de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i følgende nr. I.1–I.6 benyttes.

I.1. Tillaging og forsendelse av fiskeprøver

I.1.1. Vev til virologisk undersøkelse i cellekultur

Før forsendelse eller overføring til laboratoriet skal deler av de organene som skal undersøkes, fjernes fra fisken med sterile disseksjonsinstrumenter og overføres til sterile plastrør med transportmedium.

Mengden fiskemateriale som er egnet til virologisk undersøkelse i cellekultur og RT-qPCR, avhenger av fiskens størrelse. Vevet det skal tas prøver av, er derfor hel yngel (lengde < 4 cm), indre organer, herunder nyre (4 cm < lengde < 6 cm), eller, for større fisk, nyre, milt, hjerte og/eller hjerne samt rognvæske fra stamfisk på gytetidspunktet.

Rogn- eller spermvæske eller organdeler fra høyst ti fisk kan samles i et sterilt rør som inneholder minst 4 ml transportmedium, og utgjør én samleprøve. Vevet i hver prøve skal veie minst 0,5 gram (g).

Den virologiske undersøkelsen i cellekultur skal starte så raskt som mulig og senest 48 timer etter prøvetakingen. I unntakstilfeller kan den virologiske undersøkelsen starte senest 72 timer etter prøvetakingen, forutsatt at materialet som skal undersøkes, er beskyttet av et transportmedium og at kravene til temperatur under transport kan oppfylles.

I.1.2. Prøver til analysering med revers transkriptasepolymerasekjedereaksjon (RT-PCR eller RT-qPCR)

Fiskeprøvene skal tas ved hjelp av et sterilt instrument og overføres til et sterilt plastrør med transportmedium i samsvar med framgangsmåten beskrevet i nr. I.1.1. Vev fra ti fisk kan samles i et rør og utgjør én samleprøve. Dersom mengden inokulat er liten, kan vev fra opptil fem fisk benyttes. Alternativt kan prøver samles i RNA-stabiliserende reagenser, f.eks. 0,2 g vev/ml reagens i henhold til produsentens anbefalinger, selv om hver fisk skal behandles separat og ikke skal samles med andre i prøvene på grunn av den lille mengden materiale som skal benyttes til ekstraksjon.

Hel fisk kan også sendes til laboratoriet.

I.2. Forsendelse av fiskeprøver

Rør med fiskevev i transportmedium til celledyrking eller til RT-PCR-/RT-qPCR-analyse plasseres i isolerte beholdere, f.eks. tykkveggede bokser av polystyren, sammen med en tilstrekkelig mengde is eller et alternativt kjølemiddel med samme kjøleeffekt for å sikre at prøvene oppbevares kjølig under transport til laboratoriet. Innfrysing av prøvene må imidlertid unngås. Prøvens temperatur under transport må aldri overstige 10 °C, og ved mottak må det fremdeles være is i transportboksen, eller én eller flere fryseblokker må fremdeles være helt eller delvis fryst.

Hel fisk kan sendes til laboratoriet dersom kravene til temperatur under transport omhandlet i første ledd, kan oppfylles. Hel fisk pakkes i absorberende papir og sendes deretter i en plastpose. Levende fisk kan også sendes.

I.3. Innsamling av supplerende diagnostisk materiale

Dersom diagnoselaboratoriet har godkjent det, kan det tas prøver av annet fiskevev som tillages med henblikk på supplerende undersøkelser.

I.4. Tillaging av prøver til undersøkelse i cellekultur og med RT-qPCR

I.4.1. Innfrysing i unntakstilfeller

Dersom det oppstår praktiske vansker som gjør det umulig å behandle fiskevevsprøvene innen 48 timer etter at de er tatt, kan vevsprøvene fryses i transportmedium ved høyst -20 °C og den virologiske undersøkelsen utføres innen 14 dager. Fiskevev må imidlertid bare fryses og tines én gang før undersøkelsen. Årsaken til innfrysing av fiskevevsprøvene skal registreres hver gang.

I.4.2. Homogenisering av organer

På laboratoriet homogeniseres fiskevevet i rørene fullstendig, enten ved hjelp av en stomacher, blander eller morter og pistill med steril sand, deretter suspenderes vevet i det opprinnelige transportmediet.

Dersom en prøve består av en hel fisk som er kortere enn 4 cm, findeles den med en steril saks eller skalpell etter at den delen av kroppen som er plassert bak gattåpningen, er fjernet. Dersom en prøve består av en hel fisk med en kroppslengde på 4–6 cm, tas det prøver av indre organer, herunder nyre. Dersom en prøve består av en hel fisk som er over 6 cm lang, tas vevsprøvene som beskrevet i nr. I.1. Vevsprøvene findeles med en steril saks eller skalpell og homogeniseres som beskrevet i første ledd i dette nummer, og suspenderes i transportmedium.

Det endelige forholdet mellom vevsmateriale og transportmedium skal justeres på laboratoriet til 1:10.

I.4.3. Sentrifugering av homogenat

Homogenatet sentrifugeres i en kjølesentrifuge ved 2–5 °C og 2 000–4 000 × g i 15 minutter, hvorpå supernatanten samles opp og kan behandles med antibiotika i enten fire timer ved 15 °C eller over natten ved 4–8 °C. Dersom prøven er sendt i et transportmedium, kan behandling av supernatanten med antibiotika utelates.

Dersom det oppstår praktiske vansker, f.eks. at inkubatoren går i stykker eller det oppstår problemer med cellekulturer, som gjør det umulig å inokulere celler innen 48 timer etter at fiskevevsprøvene er tatt, kan supernatanten fryses ved -80 °C og den virologiske undersøkelsen utføres innen 14 dager.

Dersom den oppsamlede supernatanten oppbevares ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ innen 48 timer etter prøvetaking, kan den bare gjenbrukes én gang til virologisk undersøkelse.

Før inokulering av cellene blandes supernatanten med like deler av en passende fortynnet blanding av antisera mot de stedegne serotypene av infeksjøs pankreasnekrosevirus (IPN-virus) og inkuberes med dette i minst én time ved $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ eller høyst 18 timer ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antiserumets titer skal være minst 1/2 000 i en 50 % plaque-nøytralisasjonstest.

Hensikten med å behandle alle inokulater med antiserum mot IPN-virus er å hindre at det utvikles en sykdomsframkallende effekt (CPE) som følge av IPN-virus i inokulerte cellekulturer. Dette vil redusere de virologiske undersøkelsesens varighet og antall tilfeller der forekomst av CPE vil måtte oppfattes som et mulig tegn på VHS- eller IHN-virus.

Når prøver stammer fra produksjonsheter som anses for å være frie for IPN, kan behandling av inokulater med antiserum mot IPN-virus utelates.

I.4.4. Tillaging av prøver til RT-PCR- og RT-qPCR-baserte overvåkingsprogrammer

Dersom prøvene er plassert i transportmedium, benyttes framgangsmåten beskrevet i nr. I.4.2 og I.4.3. Etter sentrifugering samles supernatanten opp og RNA ekstraheres. Dersom det ikke skal foretas ytterligere undersøkelser rett etter sentrifugering, fryses prøvene omgående ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eller lavere.

Ved analysing av fiskevev som er konservert i RNA-stabiliserende reagens, utføres det etterfølgende arbeidet innenfor følgende tidsfrister for prøver oppbevart ved forskjellige temperaturer:

prøver oppbevart ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$: 1 dag,

prøver oppbevart ved $25\text{ }^{\circ}\text{C}$: 1 uke,

prøver oppbevart ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$: 1 måned,

prøver oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$: på ubestemt tid.

Samleprøver i RNA-stabiliserende reagens skal behandles som enkeltprøver i RNA-stabiliserende reagens. For prøver som samles i RNA-stabiliserende reagens, skal prøvemengden ikke overskride den som anbefales av produsenten for ekstraksjon med RNA-sett, f.eks. RNeasy Minikit (Qiagen) eller lignende. Dersom det lages større samleprøver, må ekstraksjonssettene eller -metodene gjenspeile dette.

Prøver som er tatt i RNA-stabiliserende reagenser, skal ikke benyttes til celledyrking.

I.4.5. Samleprøver til RT-qPCR

Ettersom RT-qPCR-protokollene har lik eller høyere følsomhet enn celledyrkingsmetodene, kan det ved PCR være akseptabelt å benytte supernatant fra homogenisert fiskevevsmateriale bestående av organer fra opptil ti fisk samlet i cellekulturmedium. Ettersom det benyttes en mye mindre mengde inokulat ved PCR enn ved celledyrking, skal alt fiskevev være nøye homogenisert før materialet samles med henblikk på ekstraksjon.

Samme prinsipp skal også benyttes dersom prøvene er tatt i RNA-stabiliserende reagenser. I dette tilfellet er det imidlertid ofte vanskelig å innhente et representativt materiale fra opptil ti fisk i ett rør, og antall fisk per samleprøve skal derfor reduseres til 2–5.

I.5. Virologisk undersøkelse i cellekultur

I.5.1. Cellekulturer og medier

Celler fra cellelinjen Bluegill fry (BF-2) eller cellelinjen Rainbow trout gonad (RTG-2) og enten *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) eller Fathead minnow (FHM) dyrkes ved $20\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i et egnet medium, dvs. Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), eller modifikasjoner av dette, tilsatt 10 % føtalt bovint serum og antibiotika i standardkonsentrasjoner.

Når cellene dyrkes i lukkede glass, bufres mediet med hydrogenkarbonat. Mediet som benyttes til dyrking av celler i åpne enheter, kan bufres med tris(hydroksymetyl)aminometan-HCl (Tris-HCl) (23 mM) og natriumhydrogenkarbonat (6 mM). pH-verdien skal være $7,6 \pm 0,2$.

Cellekulturene som skal benyttes til inokulering med fiskevevsmateriale, skal når det er mulig, være unge, normalt én dag gamle monolag-cellekulturer. Cellekulturer som er 4–48 timer gamle, kan imidlertid aksepteres. Cellene skal være aktivt voksende ved inokuleringen.

I.5.2. Inokulering av cellekulturer

For å hindre homolog interferens skal antibiotikabehandlede organsuspensjoner inokuleres i cellekulturer i to fortyntninger, dvs. primærfortynningen pluss en fortyntning på 1:10 av denne, noe som fører til sluttfortynninger av vevsmateriale i cellekulturmedium på henholdsvis 1:100 og 1:1 000. Minst to cellelinjer skal inokuleres i samsvar med nr. I.5.1. Forholdet mellom mengden inokulat og volumet av cellekulturmedium skal være omtrent 1:10.

For hver fortyntning og hver cellelinje skal det benyttes et celleareal på over 2 cm^2 , noe som tilsvarer én brønn i en cellekulturplate med 24 brønner. Cellekulturplater skal benyttes når det er mulig.

I.5.3. Inkubasjon av cellekulturer

De inokulerte cellekulturene inkuberes ved $15 \text{ }^\circ\text{C}$ i 7–10 dager. Dersom cellekulturmediet endrer farge fra rød til gul, noe som tyder på forsurening av mediet, justeres pH-verdien med steril hydrogenkarbonatløsning eller tilsvarende for å sikre cellenes mottakelighet for virusinfeksjon.

Minst hver sjettede måned eller ved mistanke om at cellenes mottakelighet er redusert skal fryste lagre av VHSV og IHNV titreres for å kontrollere cellekulturenes mottakelighet for infeksjon. Dersom det er mulig, skal framgangsmåten beskrevet i avsnitt III benyttes.

I.5.4. Mikroskopi

Inokulerte cellekulturer skal undersøkes jevnlig, minst tre ganger i uken, ved $40\text{--}150\times$ forstørrelse med tanke på forekomst av CPE. Dersom det observeres en tydelig CPE, startes framgangsmåtene for virusidentifisering i samsvar med nr. I.6 umiddelbart.

I.5.5. Subkultivering

Dersom ingen CPE er utviklet etter primærinkubasjonen i 7–10 dager, skal det foretas subkultivering med friske cellekulturer på et celleareal av samme størrelse som primærkulturens.

Delmengder av medium (supernatant) fra alle kulturer eller brønner som utgjør primærkulturen, samles i henhold til cellelinje 7–10 dager etter inokulering, og inokuleres deretter i homologe cellekulturer som er uforyntnet og fortyntnet 1:10 (som gir sluttfortynninger på henholdsvis 1:10 og 1:100 av supernatanten), som beskrevet i nr. I.5.2. Alternativt inokuleres delmengder av 10 % av det mediet som utgjør primærkulturen, direkte i en brønn med frisk cellekultur (dvs. subkultivering fra brønn til brønn). Før inokuleringen kan det foretas preinkubasjon av fortyntningene med antiserum mot IPN-virus i en passende fortyntning som beskrevet i nr. I.4.3.

De inokulerte kulturene inkuberes deretter i 7–10 dager ved $15 \text{ }^\circ\text{C}$ og undersøkes i samsvar med nr. I.5.4.

Dersom det oppstår en giftig CPE i løpet av de første tre inkubasjonsdagene, foretas subkultivering på dette stadiet, men cellene skal deretter inkuberes i sju dager og subkultiveres igjen med ytterligere sju dagers inkubasjon. Dersom det utvikles en giftig CPE etter tre dager, skal cellene subkultiveres én gang og inkuberes slik at det går i alt 14 dager fra primærinokuleringen. Det må ikke være tegn på giftighet i de siste sju dagene av inkubasjonen.

Dersom det oppstår bakteriell forurensning til tross for behandling med antibiotika, skal supernatanten før subkultivering sentrifugeres ved $2\ 000\text{--}4\ 000 \times g$ i 15–30 minutter ved $2\text{--}5 \text{ }^\circ\text{C}$ eller filtreres gjennom et $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ filter (membran med svak proteinbinding) eller begge deler. Framgangsmåtene for subkultivering er de samme som dem som er beskrevet for giftig CPE i fjerde ledd i dette nummer.

Dersom ingen CPE forekommer, kan testen erklæres som negativ.

I.6. Virusidentifisering

Dersom det observeres tegn på CPE i en cellekultur, samles mediet (supernatanten) opp og undersøkes med én eller flere av følgende metoder: enzymmerket antistoffprøve (ELISA), immunfluorescens (IF), nøytralisasjon, RT-PCR eller RT-qPCR. Dersom disse testene ikke fører til en sikker identifisering av viruset i løpet av én uke, skal supernatanten sendes til det nasjonale referanselaboratoriet eller til EU-referanselaboratoriet for fiskesykdommer, omhandlet i vedlegg VI til direktiv 2006/88/EF, med henblikk på umiddelbar identifisering.

I.6.1. ELISA

Det skal utføres en antigen-ELISA med doble antistoffer for å identifisere virusisolatet. Mikrotiterplater belegges med 50 µl/brønn (0,9 µg) protein A-rensede immunglobuliner (Ig) av dokumentert kvalitet fra kaninantiserum mot IHNV eller VHSV fortynnet i karbonatbuffer (pH 9,6) som inneholder 15 mM natriumazid, og inkuberes fra 18 timer til to uker ved 4 °C.

På en fortynningsplate fortynnes hver prøve som inneholder 1 % Triton X-100, og de positive kontrollene fortynnes med bufferløsning (dvs. fosfatbufret saltløsning (PBS)-T-BSA, 1 % BSA) i en firfoldig fortynning: ufortynnet, 1:4, 1:16, 1:64. ELISA-platene vaskes i PBS som inneholder 0,05 % Tween-20 (PBS-T), og 50 µl av hver fortynning overføres fra fortynningsplaten til den vaskede og belagte ELISA-platen.

I neste trinn inkuberes ELISA-platene i 30 minutter ved 37 °C. Deretter vaskes platene og inkuberes i 30 minutter ved 37 °C med spesifikke monoklonale antistoffer (dvs. MAb IP5B11 til identifisering av VHSV og Hyb 136-3 til identifisering av IHNV). 50 µl kaninantistoffer mot mus konjugert med pepperrotperoksidase (HRP) fortynnet 1:1 000 i PBS-T-BSA overføres til ELISA-platen.

Etter en ny vasking startes reaksjonene ved å tilsette 50 µl/brønn ortofenylendiamin (OPD). ELISA-platene inkuberes mørkt i 20 minutter ved romtemperatur, og reaksjonen stoppes ved å tilsette 100 µl/brønn 0,5 M H₂SO₄.

Absorbans måles ved en bølgelengde på 492 og 620 nm i en ELISA-leser. Prøvene erklæres som positive eller negative når testresultatene er sammenlignet med absorbansverdiene for de positive og negative kontrollene. Generelt anses prøver med kombinert absorbans (A) < 0,5 for ufortynnet materiale som negative, prøver med A-verdier mellom 0,5 og 1,0 anses som mistenkelige, og prøver med A-verdier > 1,0 anses som positive.

Andre ELISA-versjoner med dokumentert lignende effektivitet kan benyttes istedenfor dem som omhandles i dette nummer.

I.6.2. Immunfluorescens (IF)

De listeførte sykdomsframkallende virusene VHSV og IHNV identifiseres ved å infisere celler i 96-brønners «Black»-plater, konvensjonelle 24-brønnsplater eller på dekkglass i 24-brønnsplater. Når IHNV eller VHSV eller begge identifiseres ved å infisere celler på dekkglass, skal følgende protokoll benyttes:

- a) På dekkglass utstrykes det celler med en tetthet som gir 60–90 % sammenflyt etter 24 timers dyrking. Når det er mulig, skal det til dette formålet benyttes EPC-celler, ettersom de adhererer svært godt til glassoverflater, men andre cellelinjer, f.eks. BF-2, RTG-2 eller FHM, kan også benyttes. 150 µl cellekultursupernatant i to forskjellige fortynninger (1:10 og 1:1 000) inokuleres i duplikat på én dag gamle monolag og inkuberes ved 15 °C i 24 timer.
- b) Deretter fjernes cellekulturmediet, og de infiserte cellemonolagene fikseres med 0,5 ml iskald, vandig acetonløsning (80 % vol/vol). Fikseringen utføres i avtrekkshette i 15 minutter ved romtemperatur, deretter fjernes acetonløsningen og dekkglassene lufttørkes i minst 30 minutter. På dette stadiet skal platene enten behandles umiddelbart eller oppbevares ved –20 °C til senere bruk.
- c) Spesifikke monoklonale antistoffer (dvs. MAb IP5B11 til identifisering av VHSV og Hyb 136-3 til identifisering av IHNV) fortynnes i 0,01 M PBST (pH 7,2) i den fortynningen som anbefales av leverandøren av de monoklonale antistoffene; 50–100 µl/brønn tilsettes i det fikserte monolaget, og platene inkuberes i én time ved 37 °C i et fuktammer.

- d) Dekkglassene vaskes forsiktig tre ganger med PBS som inneholder 0,05 % Tween-20 (PBS-T), og bufferen fjernes helt etter siste skylling. Cellene inkuberes deretter i én time ved 37 °C med antistoff mot mus-immunoglobulin konjugert med fluoresceinisotiocyanat (FITC) eller tetrametylrhodamin-5-(og-6-)-isotiocyanat (TRITC) brukt som primærantistoff og fortynnet i henhold til leverandørens anvisninger, deretter vaskes cellene i PBS-T og tørkes. Fargede kulturer monteres på objektglass ved hjelp av glyserol-saltløsning og undersøkes under innfallende ultrafiolett (UV) lys. 10 × eller 12 × okularer og et × 25 eller × 40 objektiv med blender på henholdsvis > 0,7 og > 1,3 skal benyttes.

Andre IF-teknikker (med hensyn til cellekulturer, fiksering og antistoffer av referanse kvalitet) med dokumentert tilsvarende effektivitet kan benyttes.

I.6.3. Nøytralisasjon

Celler fra den oppsamlede supernatanten fjernes ved sentrifugering (2 000–4 000 × g) eller membranfiltrering (0,45 µm) med en membran med svak proteinbinding, og supernatanten fortynnes 1:100 og 1:10 000 i cellekulturmedium.

Delmengder av minst to supernatantfortynninger blandes og inkuberes separat i 60 minutter ved 15 °C med like deler av følgende reagenser:

- Serum som inneholder gruppespesifikke antistoffer mot VHSV fortynnet i forholdet 1:50 (vol/vol).
- Serum som inneholder gruppespesifikke antistoffer mot IHNV fortynnet i forholdet 1:50 (vol/vol).
- En blanding av antisera mot de stedege serotypene av IPNV fortynnet i forholdet 1:50 (vol/vol).
- Medium alene (positiv kontroll).

Minst to cellekulturer inokuleres ved hjelp av 50 µl av supernatant-serumblandingen for hvert virus og inkuberes deretter ved 15 °C. Utviklingen av CPE kontrolleres som beskrevet i nr. I.5.4.

VHSV-stammer og -isolater som ikke reagerer i nøytralisasjonstester, skal identifiseres med IF eller ELISA.

Andre nøytralisasjonstester med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

I.6.4. RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1. Tillaging av viralt RNA

Alt arbeid med RNA skal utføres på is og med hansker.

RNA skal ekstraheres ved bruk av fenol/kloroform-metoden eller med spinnkolonner med affinitet for RNA i henhold til produsentens anvisninger. Det kan benyttes kommersielt tilgjengelige RNA-ekstraksjonssett som vil gi RNA av høy kvalitet, som er egnet for bruk sammen med RT-PCR-protokollene beskrevet i numrene nedenfor.

RNA resuspenderes i destillert RNase-fritt vann (dvs. vann behandlet med 0,1 % dietylpyrokarbonat) eller en egnet elueringsbuffer.

I.6.4.2. RT-PCR

Følgende primere skal benyttes til påvisning av IHNV:

Foroverprimer 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3'.

Reversprimer 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'.

Følgende sykluser skal benyttes (ett-trinns RT-PCR): 1 syklus: 50 °C i 30 minutter, 1 syklus: 95 °C i 2 minutter, 30 sykluser: 95 °C i 30 sekunder, 50 °C i 30 sekunder, 72 °C i 60 sekunder, 1 syklus: 72 °C i 7 minutter og bløtlegging ved 4 °C.

Følgende primere skal benyttes til påvisning av VHSV:

VN For 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3'.

VN Rev 5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3'.

Følgende sykluser skal benyttes (ett-trinns RT-PCR): 50 °C i 30 minutter, 95 °C i 15 minutter, 35 sykluser ved 94 °C i 30 sekunder, 55 °C i 30 sekunder og 68 °C i 60 sekunder. Deretter skal reaksjonen holdes ved 68 °C i 7 minutter.

RT-PCR-reaksjonenes kvantitet og spesifisitet skal vurderes ved hjelp av gelelektroforese i 1,5 % agarosegel med etidiumbromid og observeres ved hjelp av UV-gjennomlysning. Et PCR-amplikon på 693 bp kan observeres for IHN. For VHSV skal størrelsen være 505 bp.

PCR-resultatene kan variere ut fra forholdene analysen utføres under, dvs. det kan være behov for å optimalisere de termiske protokollene avhengig av hvilken termosyklus som benyttes. Videre kan det forekomme falskt positive resultater på grunn av feil hybridisering av primere eller kontaminering på laboratoriet. For å unngå enhver tvil skal det derfor benyttes egnede positive og negative kontroller og sekvenserte amplikoner. Når det gjelder VHSV-primere, må det utvises særlig forsiktighet ved bruk av BF-2-celler, ettersom primerne kan reagere med cellelinjens DNA/RNA og gi falskt positive resultater av lignende størrelse. Når supernatant fra BF-2-celler testes, skal alle amplifiserte PCR-fragmenter sekvenseres.

I.6.4.3. RT-qPCR for VHSV

Når det gjelder VHSV, utføres amplifisering med følgende primere og probe:

Foroverprimer: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3'.

Reversprimer: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3'.

Probe: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

Ett-trinns RT-qPCR:

I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Sykluser: 50 °C i 30 minutter, 95 °C i 15 minutter, 40 sykluser ved 94 °C i 15 sekunder, 60 °C i 40 sekunder, 72 °C i 20 sekunder (justeres ved behov). Andre RT-PCR- eller RT-qPCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

I.6.4.4. RT-qPCR for IHN

Når det gjelder IHN, skal amplifisering utføres ved bruk av følgende primere og probe:

Foroverprimer: 5'-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3'.

Reversprimer: 5'-TTCTTTGCGGCTTGTTGA-3'.

Probe: 5'-6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

Totrinns RT-qPCR:

Ettersom følgende analyse bygger på en amplifisering i to trinn, må det for å unngå kontaminering utvises særlig stor forsiktighet ved håndtering av rørene mellom første og andre reaksjon.

Sykluser (etter RT-trinnet): 50 °C i 2 minutter, 95 °C i 10 minutter, deretter 40 sykluser ved 95 °C i 15 sekunder og 60 °C i 1 minutt (justeres ved behov).

Andre RT-PCR- eller RT-qPCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

II. **Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om VHS eller IHN eller begge ved mistanke om utbrudd**

Dersom det kreves at det utføres en laboratorieundersøkelse for å bekrefte eller utelukke forekomst av IHN eller VHS eller begge, i samsvar med artikkel 57 bokstav b) i direktiv 2006/88/EF, ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i del 1 nr. II.3 i vedlegg I, skal følgende diagnostiske metoder og framgangsmåter benyttes:

- Konvensjonell virusisolering med etterfølgende serumnøytralisasjon, immunkjemisk eller molekylær virusidentifisering.
- Viruspåvisning med RT-PCR eller RT-qPCR.
- Andre diagnostiske metoder, f.eks. IFAT, ELISA, RT-PCR, IHK.

- II.1. Konvensjonell virusisolering med etterfølgende virusidentifisering
- II.1.1. Utvelging av prøver
Minst ti fisk med typiske tegn på IHN eller VHS skal velges for undersøkelse.
- II.1.2. Tillaging og forsendelse av fiskeprøver
Ved tillaging og forsendelse med henblikk på konvensjonell virusisolering skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.2 benyttes.
- II.1.3. Innsamling av supplerende diagnostisk materiale
Ved innsamling av supplerende materiale med henblikk på konvensjonell virusisolering skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.3 benyttes.
- II.1.4. Tillaging av prøver til cellekulturundersøkelse
Ved tillaging av prøver til cellekulturundersøkelse med henblikk på konvensjonell virusisolering skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.4 benyttes.
- II.1.5. Virologisk undersøkelse i cellekultur
Ved virologisk undersøkelse med henblikk på konvensjonell virusisolering skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.5 benyttes.
- II.1.6. Virusidentifisering
Ved virusidentifisering med henblikk på konvensjonell virusisolering skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.6 benyttes.
- II.2. Viruspåvisning med RT-qPCR
- II.2.1. Utvelging av prøver
Ved utvelging av prøver med henblikk på viruspåvisning med RT-qPCR skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.1.2 benyttes.
- II.2.2. Tillaging og forsendelse av fiskeprøver
Ved tillaging og forsendelse med henblikk på viruspåvisning med RT-qPCR skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.2 benyttes.
- II.2.3. Innsamling av supplerende diagnostisk materiale
Ved innsamling av supplerende diagnostisk materiale med henblikk på viruspåvisning med RT-qPCR skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.3 benyttes.
- II.2.4. Tillaging av prøver til RT-qPCR
Ved tillaging av prøver med henblikk på viruspåvisning med RT-qPCR skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.6.4.1 benyttes.
- II.2.5. RT-qPCR
Ved viruspåvisning med RT-qPCR skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.6.4.1, I.6.4.3 og I.6.4.4 benyttes.
- II.3. Andre diagnostiske metoder
Supernatant, tillaget som beskrevet i nr. I.4.3, kan analyseres med ELISA, indirekte fluorescens-antistoffteknikk (IFAT) eller RT-PCR i samsvar med henholdsvis nr. I.6.1, I.6.2 eller I.6.4. Vevsmaterialet kan analyseres med andre diagnostiske metoder, f.eks. med IFAT på frysesnitt eller immunhistokjemi på formalinfiksert vevsmateriale. Disse raske metodene skal suppleres med en virologisk undersøkelse i samsvar med enten nr. II bokstav a) eller nr. II bokstav b) innen 48 timer etter prøvetaking dersom
- a) resultatet er negativt, eller
- b) resultatet er positivt med materiale fra det første tilfellet av IHN eller VHS.

III. Framgangsmåte for titrering for å kontrollere cellekulturenes mottakelighet for infeksjon

Ved titrering for å kontrollere cellekulturenes mottakelighet for infeksjon, som omhandlet i nr. I.5.3, skal følgende framgangsmåter i dette nummer benyttes.

Det skal benyttes minst to VHSV-isolater og ett IHNV-isolat. Isolatene skal representere hovedgruppen av virus i Den europeiske union, dvs. for VHSV ett sykdomsframkallende isolat fra regnbueørret i ferskvann og ett marint isolat som er sykdomsframkallende for piggvar, og for IHNV en EU-stamme som er sykdomsframkallende for regnbueørret. Det skal benyttes veldefinerte isolater fra medlemsstatene. Viruspartier i cellekulturer med lavt passasjetall dyrkes i cellekulturflasker på BF-2- eller RTG-2-celler for VHSV og på EPC- eller FHM-celler for IHNV. Det skal benyttes cellekulturmedium med minst 10 % serum. Til inokulering benyttes en lav MOI (< 1).

Ved full CPE høstes viruset ved sentrifugering av cellekultursupernatanten ved $2\,000 \times g$ i 15 minutter, filtersteriliseres gjennom et 0,45 µm membranfilter og fordeles i merkede kryorør. Viruset skal oppbevares ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En uke etter innfrysing tines tre glass med hvert virus i kaldt vann og titreres på sine respektive cellelinjer. Minst hver sjettede måned, eller ved mistanke om at en cellelinjes mottakelighet er redusert, tines og titreres hvert virusisolat.

Framgangsmåtene for titrering skal beskrives detaljert, og samme framgangsmåte skal benyttes hver gang.

Titrering til fortynningsendepunktet skal gjentas minst seks ganger for hvert fortynningstrinn. Titerne skal sammenlignes med tidligere titer. Dersom titeren for et av de tre virusisolatene faller med en faktor på minst to logaritmer sammenlignet med den opprinnelige titeren, skal cellelinjen ikke lenger benyttes til overvåkingsformål.

Dersom det oppbevares forskjellige cellelinjer på laboratoriet, skal hver rekke undersøkes separat.

Dokumentasjonen skal oppbevares i minst ti år.

DEL 2

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER FOR OVERVÅKING OG BEKREFTELSE AV KHV-SYKDOM (KHVD)

I. Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om KHVD

Dersom det kreves at det utføres en laboratorieundersøkelse for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om KHVD i samsvar med artikkel 57 bokstav b) i direktiv 2006/88/EF ved bruk av de diagnostiske metodene beskrevet i del 2 avsnitt III i vedlegg I, skal de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i nr. I.1–I.2 i denne del benyttes.

I.1. Tillaging av fiskeprøver

Til diagnostiske formål kan fisken (sendt levende eller avlivet og pakket separat i forseglede aseptiske beholdere), eller alternativt fryste organer eller organdeler konservert i 80 % til absolutt etanol eller virustransportmedium (må behandles innen 48 timer etter prøvetaking), benyttes til testing med konvensjonelle PCR- eller qPCR-baserte metoder.

Med henblikk på påvisning av KHV skal det tas prøver av gjeller og nyre, i tillegg kan milt, hjerne og tarm inngå i en ytterligere separat prøve. I akutte tilfeller kan vevsmateriale fra opptil fem fisk utgjøre en samleprøve.

Videre kan prøver som tas uten at dyret avlives, f.eks. blodprøver, svaberprøver fra gjeller, biopsi av gjeller og skraperprøver fra slimhinner, i visse tilfeller benyttes (det vil si at svært verdifull fisk kan benyttes ved mistanke om forekomst av KHV).

I.1.1. DNA-ekstraksjon

DNA skal ekstraheres i henhold til standardframgangsmåter.

Det kan benyttes kommersielt tilgjengelige DNA-ekstraksjonssett som gir DNA av høy kvalitet, som er egnet for bruk sammen med PCR-protokollene beskrevet i nr. I.2.

I.2. Påvisning og identifisering av agens med metoder basert på polymerasekjedereaksjon (PCR)

I.2.1. Påvisning av KHV med qPCR

Til påvisning av KHV med qPCR skal følgende qPCR-analyse benyttes:

Foroverprimer (KHV-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTG -3'.

Reversprimer (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3'.

Probe (KHV-109p): 5'-FAM- CTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'.

Sykluser: 1 syklus ved 95 °C i 15 minutter, deretter 40 sykluser ved 94 °C i 15 sekunder og 60 °C i 60 sekunder. I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Andre qPCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

I.2.2. Påvisning av KHV med konvensjonell PCR

Analysen beskrevet i dette nummer, som er rettet mot tymidinkinase-genet (TK) i KHV, skal benyttes. Andre PCR-analyser med dokumentert tilsvarende følsomhet og spesifisitet som den analysen som beskrives, kan også benyttes.

Foroverprimer (KHV-TKf): 5'-GGGTTACCTGTAC GAG-3'.

Reversprimer (KHV-TKr): 5'-CACCCAGTAGATTA TGC-3'.

Sykluser: 1 syklus ved 95 °C i 5 minutter, deretter 35 sykluser ved 95 °C i 30 sekunder, 52 °C i 30 sekunder, 72 °C i 1 minutt og 1 syklus ved 72 °C i 10 minutter. Produktstørrelsen bør være 409 bp.

PCR-resultatene kan variere ut fra forholdene analysen utføres under, dvs. det kan være behov for å optimalisere de termiske protokollene avhengig av hvilken termosyklus som benyttes. Videre kan det forekomme falskt positive resultater på grunn av feil hybridisering av primere eller kontaminering. I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Andre PCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

Den første påvisningen i et område skal bekreftes ved sekvensering eller sendes til et nasjonalt referanselaboratorium eller til EU-referanselaboratoriet for fiskesykdommer, omhandlet i vedlegg VI til direktiv 2006/88/EF, med henblikk på umiddelbar identifisering.

II. **Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for overvåking av KHVD**

Når det utføres prøvetaking og laboratorieundersøkelse for å oppnå eller opprettholde visse helsestater med hensyn til KHVD, som omhandlet i del 2 avsnitt I i vedlegg I, ved bruk av de diagnostiske metodene beskrevet i del 2 avsnitt II eller III i nevnte vedlegg, skal de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i følgende nr. II.1 og II.2 i denne del benyttes.

II.1. Tillaging av fiskeprøver

Dersom det er mulig, skal det tas prøver av fisk som i en lengre periode er blitt holdt ved en temperatur der viruset kan utvikle seg (dvs. 2–3 uker ved 15–26 °C). Dersom det er mulig, skal prøvene tas 24 timer, og senest 72 timer, etter driftsrutiner som kan reaktivere viruset i fisk med status som virusbærer, f.eks. håving eller transport, for å øke muligheten for påvisning av KHV.

Med henblikk på overvåking av KHVD kan fisken (sendt levende eller avlivet og pakket separat i forseglede aseptiske beholdere), eller alternativt fryste organer eller organdeler konservert i 80–100 % alkohol eller virustransportmedium (må behandles innen 48 timer etter prøvetaking), benyttes til testing med PCR-baserte metoder. Med henblikk på overvåking av KHVD skal det tas prøver av gjelle- og nyrevev.

Med henblikk på overvåking av KHVD skal samleprøver unngås når det er mulig. Dersom det er nødvendig å lage samleprøver, kan vevsmateriale fra høyst to fisk utgjøre en samleprøve. Større prøver skal homogeniseres med en morter og pistill eller i en stomacher, og delprøver skal tas ut til DNA-ekstraksjon før klaring. Alternativt kan det tas ut delprøver fra hvert vev i prøven som plasseres i lyseringsrør.

II.1.1. DNA-ekstraksjon

DNA skal ekstraheres i henhold til standardframgangsmåter. Det kan benyttes kommersielt tilgjengelige DNA-ekstraksjonssett som gir DNA av høy kvalitet, som er egnet for bruk sammen med PCR-protokollene beskrevet i nr. II.2.

Det akseptable forholdet mellom vev og medium er 1:9 w/v. I testene skal det inngå 20–25 mg vevsmateriale.

II.2. Overvåking av KHVD med PCR-baserte metoder

Til overvåking av KHV skal qPCR benyttes. Dersom det forekommer positive prøver i et område som tidligere ikke er bekreftet som positivt, skal testresultatene bekreftes enten

- a) ved sekvensering av et PCR-produkt eller et flettet («nested») PCR-produkt fra prøvene.

Det skal være et samsvar på minst 98 % mellom den oppnådde rene konsensussekvensen og disse referansesekvensene,

- b) eller alternativt ved å sende prøvene til et nasjonalt referanselaboratorium for å få bekreftet resultatene.

II.2.1. Påvisning av KHV med qPCR

Følgende qPCR-protokoll skal benyttes:

Foroverprimer (KHV-86f): 5'- GACGCCGAGACCTTGTG -3'.

Reversprimer (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3'.

Probe (KHV-109p): 5'-FAM- CTTCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'.

Sykluser: 1 syklus ved 95 °C i 15 minutter, deretter 50 sykluser ved 94 °C i 15 sekunder og 60 °C i 60 sekunder.

qPCR-resultatene kan variere ut fra forholdene analysen utføres under, dvs. det kan være behov for å optimalisere de termiske protokollene avhengig av hvilken termosyklus som benyttes. Videre kan det forekomme falskt positive resultater på grunn av feil hybridisering av primere eller kontaminering på laboratoriet. I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Andre qPCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

II.2.2. Konvensjonell PCR for å bekrefte påvisning av KHV

For å bekrefte forekomst av infeksjon med KHV benyttes den generiske protokollen for flettet PCR beskrevet i tabell 2.1, etterfulgt av sekvensering av det amplifiserte produktet.

Tabell 2.1

Primere og vilkår for analyse med flettet («nested») PCR rettet mot alle cyprinidherpesvirus (CyHV-1, CyHV-2 and CyHV-3)

| Primernavn | Sekvens | Sykluser | Produktstørrelse |
|------------------|----------------------------|---------------------|------------------|
| CyHVpol-foreover | 5'-CCAGCAACATGTGCGACGG-3' | Første PCR-runde | 362 bp |
| CyHVpol-revers | 5'-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3' | 1 syklus: | |
| | | 95 °C i 2 minutter | |
| | | 40 sykluser: | |
| | | 95 °C i 30 sekunder | |
| | | 55 °C i 30 sekunder | |
| | | 72 °C i 45 sekunder | |
| | | 1 syklus: | |
| | | 72 °C i 10 minutter | |

| Primernavn | Sekvens | Sykluser | Produktstørrelse |
|------------------------|-----------------------------|---|------------------|
| CyHVpol-intern forover | 5'-CGACGGVGGYATCAGCCC-3' | Andre PCR-runde 1 syklus: 95 °C i 2 minutter | 339 bp |
| CyHVpol-intern revers | 5'-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3' | 40 sykluser: 95 °C i 30 sekunder 55 °C i 30 sekunder 72 °C i 45 sekunder 1 syklus: 72 °C i 10 minutter | |

PCR-resultatene kan variere ut fra forholdene analysen utføres under, dvs. det kan være behov for å optimalisere de termiske protokollene avhengig av hvilken termosyklus som benyttes. Videre kan det forekomme falskt positive resultater på grunn av feil hybridisering av primere eller kontaminering på laboratoriet. I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. PCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

Sekvenseringen kan utføres av laboratoriet eller hos eksterne foretak spesialisert på sekvensering. Sekvenseringsresultatene skal analyseres ved å sammenligne sekvensene med kjente referansesekvenser for KHV (GenBank-nummer AP008984, DQ657948 og DQ177346). Det skal være et samsvar på minst 98 % mellom den oppnådde rene konsensussekvensen og disse referansesekvensene.

DEL 3

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER FOR OVERVÅKING OG BEKREFTELSE AV INFEKSIØS LAKSEANEMI (ILA)

I. Framgangsmåter for prøvetaking med henblikk på overvåking og bekjempelse av ILA

Når det utføres prøvetaking og laboratorieundersøkelse med henblikk på overvåkings- eller utryddelsesprogrammene omhandlet i del 3 i vedlegg I eller for å bekrefte eller utelukke forekomst av ILA i samsvar med artikkel 57 bokstav b) i direktiv 2006/88/EF, skal de detaljerte metodene og framgangsmåtene beskrevet i nr. I.1, I.2 og I.3 i dette avsnitt benyttes.

I.1. Tillaging av fiskeprøver

Ved laboratorieundersøkelser som skal påvise forekomst av ILA, skal det når det er mulig, ikke lages samleprøver av fiskeprøvene. I forbindelse med overvåking av ILA kan 2–5 fisk imidlertid utgjøre en samleprøve.

Prøver til analysering med revers transkriptasepolymerasekjedereaksjon (RT-PCR) skal tas fra all fisk som omfattes av prøvetakingen. En del av mellomnyren fjernes fra fisken med et sterilt instrument og overføres til et mikrosentrifugerør med 1 ml RNA-konserverende løsning med dokumentert virkning. Vev fra opptil fem fisk kan samles i et rør med transportløsning og utgjør én samleprøve. Vekten av vevet i én prøve skal være 0,5 g. Dersom fisken er for liten til at det er mulig å oppnå en prøve med denne vekten, kan det tas ut deler av nyre, hjerte, milt, lever eller pylorusblindsekker, i denne rekkefølgen, til prøven utgjør 0,5 g.

Vev til histologisk undersøkelse skal bare tas ut fra nylig avlivet fisk med normal konstitusjon som viser kliniske tegn eller funn *post mortem* som er forenlige med forekomst av ILA. Eventuelle ytre eller indre skader skal tas med i prøven, og i alle tilfeller tas det prøver av mellomnyre, hjerte, lever, bukspyttkjertel, tarm, gjeller og milt som fjernes fra hvert individ med skalpell og overføres til 8–10 % (vol/vol) formalinbufret saltløsning. Forholdet mellom fikseringsmiddel og vev skal være minst 20:1 for å sikre tilfredsstillende konservering av vevet. Med henblikk på immunhistokjemi (IHK) skal det tas prøver fra mellomnyre og hjerte.

Vev til virologisk undersøkelse i cellekultur skal tas ut fra all fisk som omfattes av prøvetakingen. Deler av lever, fornyre eller mellomnyre, hjerte og milt skal fjernes fra fisken med et sterilt instrument og overføres til plastrør med 9 ml transportmedium. Vev fra opptil fem fisk kan samles i et rør med transportløsning og utgjør én samleprøve. Vekten av vevet i én prøve skal være $1,0 \pm 0,5$ g.

I.2. Forsendelse av fiskeprøver

Hel fisk kan transporteres til laboratoriet dersom kravene til temperatur under transport, som beskrevet i tredje ledd i dette nummer, kan oppfylles. Hel fisk skal pakkes i absorberende papir og sendes i en plastpose som kjøles som beskrevet i nevnte ledd.

Levende fisk kan også sendes, men bare under tilsyn av det nasjonale referanselaboratoriet for fiskesykdommer, og idet det tas hensyn til de andre reglene for desinfisering og biosikkerhet som gjelder ved transport av levende fisk.

Blodprøver og rør med fiskevev til virologisk undersøkelse eller RT-PCR-analyse skal plasseres i isolerte beholdere, f.eks. tykkveggede bokser av polystyren, sammen med en tilstrekkelig mengde is eller fryseblokker for å sikre at prøvene holdes kjølig under transport til laboratoriet. Innfrysing skal unngås, og ved mottak av forsendelsen må det fremdeles være is i transportboksen, eller én eller flere av fryseblokkene må fremdeles være helt eller delvis fryst. I unntakstilfeller kan RT-PCR-prøver og prøver til virologisk undersøkelse hurtiginnfrysing og transporteres til laboratoriet ved -20 °C eller lavere.

Med henblikk på RT-PCR-analyse av vev som er konservert i RNAlater, skal RNA-ekstraksjonen utføres innenfor følgende tidsrammer, avhengig av den temperaturen som prøvene oppbevares ved:

Prøver oppbevart ved 37 °C: 1 dag.

Prøver oppbevart ved 25 °C: 1 uke.

Prøver oppbevart ved 4 °C: 1 måned.

Prøver oppbevart ved -20 °C: på ubestemt tid.

Dersom fiskevev transporteres i fikseringsmiddel med henblikk på histologisk undersøkelse, skal det sendes i lekkasjesikre rør i støbbestandige beholdere. Innfrysing av prøvene må unngås.

Den virologiske undersøkelsen i cellekultur skal starte så raskt som mulig og senest 48 timer etter prøvetakingen. I unntakstilfeller kan den virologiske undersøkelsen starte senest 72 timer etter prøvetakingen, forutsatt at materialet som skal undersøkes, er beskyttet av et transportmedium og at kravene til temperatur under transport kan oppfylles.

I.3. Innsamling av supplerende diagnostisk materiale

Forutsatt at diagnoselaboratoriet godkjenner det, kan annet fiskevev enn vevet omhandlet i nr. I.1 tas ut og tillages med henblikk på supplerende undersøkelse.

II. **Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for overvåking og for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om ILA**

Når det foretas laboratorieundersøkelse for å oppnå eller opprettholde en viss helsestatus med hensyn til ILA, som omhandlet i del 3 avsnitt I i vedlegg I, eller for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om ILA i samsvar med artikkel 57 bokstav b) i direktiv 2006/88/EF ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i del 3 avsnitt II i vedlegg I, skal de detaljerte metodene og framgangsmåtene beskrevet i følgende nr. II.1–II.5 benyttes.

II.1. Undersøkelse av prøver med RT-PCR

Den diagnostiske metoden som skal benyttes til påvisning av ILAV, skal være RT-qPCR. Ettersom RT-qPCR-resultatene kan variere ut fra forholdene analysen utføres under, skal det benyttes egnede positive og negative kontroller og amplikoner for å unngå enhver tvil.

II.1.1. Ekstraksjon av totalt RNA

Alt arbeid med RNA skal utføres på is og med hansker.

Totalt RNA ekstraheres ved bruk av fenol/kloroform-metoden eller med spinnkolonner med affinitet for RNA i henhold til produsentens anvisninger.

Renset RNA resuspenderes i destillert RNase-fritt vann (dvs. vann behandlet med 0,1 % dietylpyrokarbonat).

Det ekstraherte RNAets konsentrasjon og renhet beregnes ved å måle den optiske tettheten ved 260 nm og 280 nm. En alternativ metode kan være å benytte interne kontroller rettet mot virusgenomet, som omhandlet i nr. II.1.3.

II.1.2. Påvisning av ILAV med RT-PCR

En rekke RT-PCR-metoder kan benyttes til amplifisering av ILAV-genomet. Det kan utføres totrinns RT-PCR, der RT- og PCR-reaksjonstrinnene gjennomføres i to separate rør. Det kan også utføres en ett-trinnsreaksjon, der to reaksjoner gjennomføres i ett rør. Ett-trinnsmetoden skal benyttes når det er mulig, ettersom risikoen for krysskontaminering minimeres når innholdet ikke trenger å bli overført, og denne metoden anses for å være like følsom som totrinnsmetoden.

Primerne og analysen som beskrives i dette nummer, dvs. primerparet ILA1 eller ILA2 som er rettet mot segment 8, og som er funnet å være egnet til å påvise ILAV i utbrudd og i smittebærende fisk, skal benyttes. Reversprimeren ILA2 er ikke egnet for isolater fra Nord-Amerika, og i slike tilfeller skal et alternativt primersett benyttes.

Foroverprimer (ILA1): 5'-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3'.

Reversprimer (ILA2): 5'-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3'.

Sykluser: 1 syklus ved 50 °C i 30 minutter, 1 syklus ved 94 °C i 15 minutter, 40 sykluser ved 94 °C i 30 sekunder, 55 °C i 30 sekunder, 72 °C i 60 sekunder, 1 syklus ved 72 °C i 5 minutter. Produktstørrelse: 155 bp.

PCR-resultatene kan variere ut fra forholdene analysen utføres under, dvs. det kan være behov for å optimalisere de termiske protokollene avhengig av hvilken termosyklus som benyttes. Videre kan det forekomme falskt positive resultater på grunn av feil hybridisering av primere eller kontaminering på laboratoriet. I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Andre RT-PCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

II.1.3. Påvisning av ILAV med RT-qPCR

Bruk av RT-qPCR kan øke spesifisiteten og trolig også følsomheten. Metoden kan utføres raskere fordi det ikke kreves gelelektroforese, samtidig som risikoen for krysskontaminering reduseres fordi det er mulig å beregne mengden genomisk virus-RNA i prøverøret. En ulempe ved RT-qPCR-analysen er at det ofte ikke er mulig å sekvensere amplifiserte produkter. Dersom det er tvil om det amplifiserte produktets spesifisitet, må det utføres en annen ILAV-spesifikk analyse for å kontrollere resultatet.

Analysen beskrevet i dette nummer, som er en analyse rettet mot segment 8, skal benyttes. Denne analysen skal omfatte isolater fra Den europeiske union, Det europeiske frihandelsforbund og Nord-Amerika. Når det er mulig, skal ett-trinnsmetoden benyttes, ettersom en analyse der det benyttes ett rør minimerer risikoen for krysskontaminering.

Foroverprimer: 5'-CTACACAGCAGGATGCAGATGT-3'.

Reversprimer: 5'-CAGGATGCCGGAAGTCGAT-3'.

Probe: 5'-FAM-CATCGTCGCTGCAGTTC – MGBNFQ-3'.

I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Sykluser: 1 syklus ved 50 °C i 30 minutter, 1 syklus ved 95 °C i 15 minutter, 40 sykluser ved 94 °C i 15 sekunder, 60 °C i 60 sekunder (justeres ved behov). Andre RT-PCR- eller RT-qPCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

II.1.4. Sekvensering av amplifiserte PCR-produkter

Foroverprimer (ILAs6-3F): 5'-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3'.

Reversprimer (ILAs6-2R): 5'-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3'.

I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Sykluser (ett-trinns RT-PCR): 1 syklus ved 50 °C i 30 minutter, 1 syklus ved 94 °C i 15 minutter, 40 sykluser ved 94 °C i 30 sekunder, 55 °C i 30 sekunder, 72 °C i 60 sekunder, 1 syklus ved 72 °C i 5 minutter (justeres ved behov). Andre RT-PCR- eller RT-qPCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

Alternativt kan følgende metode for sekvensering av HPR i segment 6 benyttes:

Foroverprimer: 5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3'.

Reversprimer: 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3'.

Produktstørrelse: 304 nt dersom HPR0.

RT-PCR-analyser med tilsvarende følsomhet og spesifisitet som analysene beskrevet i dette nummer, kan også benyttes.

Det amplifiserte RT-PCR-produktets renhet skal kontrolleres med gelelektroforese før sekvensering. Dersom det bare forekommer ett rent fragment, skal det renses direkte fra PCR-reaksjonen. Dersom det forekommer flere amplifiserte fragmenter, skal fragmentet av interesse renses ved hjelp av gelelektroforese. PCR-fragmentene skal renses for løsnings eller agarosegeler ved bruk av spinnkolonner med affinitet for PCR-fragmenter i henhold til produsentens anvisninger.

Sekvensering skal utføres ved bruk av amplifiseringsprimere hos eksterne foretak spesialisert på sekvensering. Resultatene skal analyseres med søkeverktøyet BLAST, og sekvensene skal sammenlignes med andre kjente sekvenser i NCBI (National Centre for Biotechnical Information i USA) database over nukleotider.

Sekvenseringen må fjerne enhver tvil om et amplifisert RT-PCR-produkts spesifisitet.

II.2. Isolering av ILAV i cellekulturer

II.2.1. Tillaging av prøver

Vevet kan oppbevares ved -80 °C. Vevet må bare fryses og tines én gang før det undersøkes. Med henblikk på overvåking og bekjempelse skal undersøkelsen utføres så raskt som mulig.

Hver prøve (samleprøve med vev i transportløsning) homogeniseres fullstendig ved hjelp av en validert homogenisator, sentrifugeres ved 2 000–4 000 × g i 15 minutter ved 0–6 °C, og supernatanten filtreres (0,45 µm) og inkuberes med et like stort volum av en passende fortyntet blanding av antisera mot de stedege serotypene av IPNV. Antiserumtiteren skal være minst 1:2 000 i en 50 % plaque-nøytralisasjonstest. Blandingen inkuberes i én time ved 15 °C. Dette utgjør inokulatet.

Hensikten med å behandle alle inokulater med antiserum mot IPN-virus (et virus som i noen deler av Europa forekommer i 50 % av alle fiskeprøver), er å hindre at det utvikles en sykdomsframkallende effekt (CPE) forårsaket av IPN-virus i inokulerte cellekulturer. En slik behandling kan utføres for å redusere de virologiske undersøkelsenes varighet og antall tilfeller der forekomst av CPE vil kunne oppfattes som et mulig tegn på ILAV. Når prøvene stammer fra produksjonsenheter som anses for å være frie for IPN, kan behandling av inokulater med antiserum mot IPN-virus utelates.

II.2.2. Inokulering i cellekulturer

Nyreceller fra atlantehavslaks (ASK-celler) skal benyttes til primær isolering av ILAV. Andre cellelinjer med dokumentert effektivitet og følsomhet med tanke på isolering av ILAV kan benyttes, idet det tas hensyn til stammevariasjoner og forskjellige stammers evne til replikasjon i forskjellige cellelinjer. ASK-cellene synes å støtte isolering og vekst av hittil kjente virusisolater, så lenge det benyttes et lavt passasjenivå. Det kan oppstå en tydeligere sykdomsframkallende effekt i ASK-celler enn i andre mottakelige cellelinjer, f.eks. SHK-1 (Salmon head kidney-1).

ASK-celler (passasje 65 eller lavere) dyrkes i et L-15-medium som inneholder 10 % føtalt bovint serum, 2 % (vol/vol) 200 mM L-glutamin og 0,08 % (vol/vol) 50 mM 2-merkaptoetanol i flerbrønnsplater. Antiserumbehandlet organsuspensjon inokuleres i unge, aktivt voksende cellekulturer slik at sluttfortynningen av vevsmaterialet i kulturmediet blir 1:1 000. For hvert organ tilsettes en suspensjon av 40 µl inokulat i en brønn med 2 ml kulturmedium. For å redusere risikoen for krysskontaminering mest mulig skal det benyttes separate 12- eller 24-brønnsplater for prøver fra forskjellige oppdrettsanlegg.

Én plate skal fungere som negativ kontroll og skal ikke inokuleres. En separat plate skal benyttes som positiv kontroll og inokuleres med et referanseisolat av ILAV på følgende måte: 100 µl av et stampreparat av ILAV (minimumstiter 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹ (50 % Tissue Culture Infective Dose) inokuleres i den første brønnen og blandes. Et volum av dette materialet overføres fra den første brønnen til den andre, slik at det oppnås en fortykning på 1:10, og blandes. Dette gjentas over hele platen slik at det oppnås seks tifoldige fortykninger. Stampreparater av ILAV kan oppbevares ved -80 °C i minst to år, men må benyttes innen tre dager etter tining. Krysskontaminering av testplatene med positivt kontrollmateriale må unngås. For å unngå denne risikoen må positive kontroller settes opp og håndteres atskilt fra testplatene. En følsomhetstest av ASK-celler mot ILAV-isolater hver sjette måned kan erstatte bruken av en positiv kontroll ved hver inokulering.

Prøvene inkuberes ved 15 ± 2 °C i opptil 15 dager. Cellekulturene undersøkes med mikroskop med tanke på CPE to ganger, dvs. 5–7 og 12–14 dager etter inokulering. Dersom en samleprøve viser CPE, igangsettes framgangsmåtene for virusidentifisering umiddelbart i samsvar med nr. II.2.4. Dersom ingen CPE observeres innen dag 14, skal IFAT, hemadsorpsjon eller RT-PCR utføres.

II.2.3. Subkultivering

Subkultivering utføres mellom dag 13 og 15. Cellekulturens supernatant tilsettes i brønner med friske, aktivt voksende celler i en egnet fortykning (1:10) i flerbrønnsplater, og inkuberes ved 14 ± 2 °C i opptil 18 dager. Cellekulturene skal undersøkes med mikroskop med tanke på CPE to ganger, dvs. 5–7 og 14–18 dager etter inokulering. Dersom en samleprøve viser CPE, igangsettes framgangsmåtene for virusidentifisering umiddelbart i samsvar med nr. II.2.4. Dersom ingen CPE observeres innen dag 14–18, utføres det en hemadsorpsjonstest eller RT-PCR.

Dersom det oppstår cytotoksisitet i løpet av de første sju dagene av inkubasjonen, utføres subkultivering på dette stadiet, og cellene inkuberes i 14–18 dager og subkultiveres på nytt med ytterligere 14–18 dagers inkubasjon. Dersom det oppstår cytotoksisitet etter sju dager, utføres subkultivering én gang, og cellene inkuberes slik at den samlede inkubasjonstiden fra primærinokuleringen er på 28–36 dager.

Dersom det oppstår bakteriell forurensning i primærkulturen, utføres testen på nytt med det vevshomogenatet som er oppbevart ved -80 °C. Før inokulering sentrifugeres vevshomogenatet ved $4\ 000 \times g$ i 15–30 minutter ved 0–6 °C, og supernatanten filtreres ved 0,22 µm. Dersom det oppstår bakteriell forurensning under subkultivering, filtreres supernatanten ved 0,22 µm, inokuleres på friske celler og inkuberes i ytterligere 14–18 dager.

II.2.4. Virusidentifiseringstester

Dersom det i noen av stadiene observeres CPE, eller dersom en hemadsorpsjonstest er positiv, utføres virusidentifisering. De foretrukne metodene for identifisering av ILAV skal være RT-PCR i samsvar med nr. II.1 og immunfluorescens (IF) i samsvar med nr. II.2.6. Dersom det antas at andre virus kan forekomme, utføres supplerende virusidentifiseringstester. Dersom nevnte tester ikke har ført til en sikker identifisering av viruset innen en uke, sendes supernatanten med tanke på umiddelbar identifisering til

- a) Verdens dyrehelseorganisasjons (OIE) referanselaboratorium for ILA eller
- b) et nasjonalt referanselaboratorium eller EU-referanselaboratoriet for fiskesykdommer omhandlet i vedlegg VI til direktiv 2006/88/EF.

II.2.5. Hemadsorpsjon

Ettersom replikasjon av ILAV i cellekulturer ikke alltid fører til CPE, skal det for hver brønn utføres en RT-PCR- eller en hemadsorpsjonstest i samsvar med dette nummer, eller en IF-test i samsvar med nr. II.2.6.

Cellekulturmediet fjernes fra hver brønn, herunder fra brønnene for positive og negative kontroller, og plasseres i merkede sterile rør. 500 µl av en 0,2 % (vol/vol) suspensjon av vaskede røde blodlegemer fra kanin eller hest, eller en 0,05 % (vol/vol) suspensjon av vaskede røde blodlegemer fra regnbueørret eller atlantehavslaks tilsettes i hver brønn og inkuberes ved romtemperatur i 45 minutter. De røde blodlegemene fjernes, og hver brønn vaskes to ganger med L-15-medium. Hver brønn undersøkes med mikroskop.

Klynger av røde blodlegemer festet til ASK-cellenes overflate er en indikasjon på en mulig infeksjon med et ortomyksovirus. Dersom en hemadsorpsjonstest er positiv, utføres det umiddelbart en virusidentifiseringstest i samsvar med nr. II.2.4.

II.2.6. Immunfluorescens (IF)

ASK-celler (passasje 65 eller lavere) dyrkes i et L-15-medium som inneholder 10 % føtalt bovint serum, 2 % (vol/vol) 200 mM L-glutamin og 0,08 % (vol/vol) 50 mM 2-merkaptoetanol i flerbrønnsplater, og benyttes ved en sammenflyt på over 50 %. Andre cellelinjer eller vekstmedier med dokumentert effektivitet kan også benyttes. 225 µl supernatant fra kulturen infisert med det antatte viruset tilsettes i hver av de to brønnene og blandes, deretter overføres 225 µl til ytterligere to brønner, dvs. en fortykning på 1:5. Ytterligere to brønner skal fungere som kontroller og skal ikke inokuleres. Prøver fra hvert sted på et oppdrettsanlegg behandles på separate plater, det samme skal viruskontrollen. Som viruskontroll skal det benyttes et referanseisolat av ILAV.

Platene inkuberes ved 14 ± 2 °C og undersøkes med mikroskop i opptil sju dager. Dersom en tidlig CPE observeres, eller dersom ingen CPE observeres i løpet av sju dager, er neste trinn fiksering. Brønnene vaskes med fosfatbufret saltløsning (PBS) og fikseres ved inkubasjon med 80 % aceton i 20 minutter ved romtemperatur. Platene lufttørkes og farges umiddelbart eller oppbevares ved 0–6 °C i høyst 24 timer før farging.

Replikatbrønner farges med en blanding av de monoklonale antistoffene (MAb) 3H6F8 og 10C9F5 mot ILAV, eller andre monoklonale antistoffer med dokumentert effektivitet og spesifisitet, fortynnes i PBS og inkuberes ved 37 ± 4 °C i 30 minutter. MAb fjernes, og platene vaskes tre ganger med 0,05 % Tween 20 i PBS. Anti-mus-IgG konjugert med fluoresceinisotiocyanat (FITC) fortynnet i PBS tilsettes i hver brønn og inkuberes ved 37 ± 4 °C i 30 minutter. Fortynningene av de forskjellige partiene av MAb og FITC-konjugat skal optimaliseres på hvert laboratorium. Antistoffene fjernes, og platene vaskes tre ganger med 0,05 % Tween 20 i PBS.

Brønnene undersøkes umiddelbart med et invertert mikroskop konfigurert for fluorescensmikroskopi med et egnet filter for eksitasjon av FITC. Dersom det observeres fluorescerende celler, skal en test anses som positiv. For at en test skal være gyldig skal de positive kontrollene gi positivt resultat, og de negative kontrollene skal gi negativt resultat.

II.3. Undersøkelse av annet vev

Metoden omhandlet i nr. II.2.6 kan benyttes på annet fiskevev, f.eks. lever, milt og hjerte, forutsatt at en rimelig mengde endotelceller, leukocytter eller lymfocytter kan plasseres på objektglasset. Fargemetoden skal være den samme for alt vev, selv om det for enkelte typer vev kan være å foretrekke å utelate farging med propidiumjodid og isteden benytte fasekontrastbelysning for å identifisere celletypene i avtrykket.

II.4. Histologi

Parafininnstøpte snitt skjæres i 5 µm tynne skiver og farges med hematoksylin og eosin.

Histologiske forandringer hos klinisk syk atlantehavslaks varierer, men kan omfatte følgende:

- a) Tallrike erytrocytter i sentralvenøs sinus og gjellenes lamellære kapillærer, der det også kan dannes tromber av erytrocytter.
- b) Multifokale til sammenflytende petekkier eller nekrose av hepatocytter eller begge i en viss avstand fra de større blodkarene i leveren, multifokal akkumulering av erytrocytter i dilaterte leversinusoider.

- c) Akkumulering av erythrocytter i blodkar i tarmens lamina propria som etter hvert kan føre til blødning i lamina propria.
- d) Miltenes stroma utspilt på grunn av akkumulering av erythrocytter.
- e) Svakt multifokal til omfattende diffus interstitiell blødning med tubulær nekrose i de blødende områdene, akkumulering av erythrocytter i renale glomeruli.
- f) Erytrofagocytose i milt og sekundærblødning i lever og nyre.

II.5. Immunhistokjemi (IHK)

Polyklonale antistoffer mot ILAV-nukleoprotein skal benyttes på parafinsnitt fra formalinfiksert vev. Organene som skal undersøkes, skal være mellomnyre og hjerte (overgangsområde, herunder alle tre kamre og klaffer). Mistanke basert på patologiske tegn kontrolleres med en positiv IHK. Histologiske snitt tillages i samsvar med standardmetoder.

1) Tillaging av vevssnitt

Vevet fikseres i nøytral fosfatbufret 10 % formalin i minst én dag, dehydreres i stigende konsentrasjoner av etanol, klares i xylen og innstøpes i parafin i henhold til standardprotokoller. Cirka 5 µm tykke snitt (for IHK plassert på poly-L-lysinbelagte objektglass) varmes opp ved 56–58 °C (høyst 60 °C) i 20 minutter, avvokses i xylen, rehydreres i fallende konsentrasjoner av etanol og farges med hematoksylin og eosin med henblikk på patomorfologi og IHK i samsvar med nr. 2.

2) Fargingsmetode for IHK

All inkubasjon utføres ved romtemperatur i et risteparat, med mindre annet er fastsatt i denne beslutning.

- a) Antigengjenfinning foretas ved å koke snittene i 0,1 M sitratbuffer (pH 6,0) i 2 × 6 minutter etterfulgt av blokkering med 5 % fettfri tørrmelk og 2 % geiteserum i 50 mM TBS (TBS, Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) i 20 minutter.
- b) Deretter inkuberes snittene over natten med primærantistoff (monospesifikt kaninantistoff mot ILAV-nukleoprotein) fortynt i TBS med 1 % fettfri tørrmelk og vaskes deretter tre ganger i TBS med 0,1 % Tween 20.
- c) Til påvisning av bundne antistoffer inkuberes snittene med alkalisk fosfatase-konjugerte antistoffer mot kanin-IgG i 60 minutter. Etter en siste vasking tilsettes Fast Red (1 mg ml⁻¹) og naftol-AS-MX-fosfat (0,2 mg ml⁻¹) med 1 mM levamisol i 0,1 M TBS (pH 8,2). La stå i 20 minutter. Deretter vaskes snittene i springvann før motfarging med Harris-hematoksylin og monteres i vandig monteringsmedium. ILAV-positive og ILAV-negative vevssnitt skal inngå som kontroller i hvert oppsett.

3) Tolking av IHK-resultater

IHK-resultatene tolkes som angitt i bokstav a) og b) som følger:

- a) Kontrollsnittene anses som positive når det observeres en klart synlig rødfarging av cytoplasma og intranukleært i endotelcellene i endokardiets blodkar. Et testsnitt anses bare som positivt dersom endotelcellene har en slik tydelig, intranukleær rødfarging.
- b) Kontrollsnittene anses som negative dersom det ikke forekommer noen betydelige fargereaksjoner.

Ettersom den intranukleære plasseringen er spesifikk for ortomyksovirusets nukleoprotein i en fase av virusreplikasjonen, men den samtidige cytoplasmiske fargingen ofte er dominerende, skal cytoplasmiske mønstre og andre fargingsmønstre uten intranukleær plassering anses som ikke-spesifikke eller usikre.

De sterkeste positive fargingsreaksjonene oppnås normalt i endotelceller fra hjerte og nyre. I svært omfattende hemoragiske lesjoner kan endotelfargingsreaksjonene være svake eller fraværende, trolig på grunn av lysis av infiserte endotelceller.

DEL 4

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER FOR OVERVÅKING OG BEKREFTELSE AV INFEKSJON MED *MARTEILIA REFRINGENS*

I. Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for diagnostisering av infeksjon med *Marteilia refringens*

Når det utføres prøvetaking og laboratorieundersøkelse for å oppnå eller opprettholde en helsestatus med hensyn til infeksjon med *Marteilia refringens*, som omhandlet i del 4 avsnitt I i vedlegg I, eller for å bekrefte eller utelukke forekomst av denne listeførte sykdommen i samsvar med artikkel 57 bokstav b) i direktiv 2006/88/EF ved bruk av de diagnostiske metodene beskrevet i del 4 avsnitt II i vedlegg I, skal de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i nr. I.1, I.2 og I.3 i denne del benyttes.

I.1. Framgangsmåte for prøvetaking

For å øke sjansene for å finne infiserte dyr, skal det prioriteres å ta prøver av individuelle bløtdyr med åpne skall eller nylig døde bløtdyr.

Etter prøvetaking oppbevares østers eller blåskjell ved 4 °C eller kjølt på is i høyst 24 timer dersom prøvene omfatter bløtdyr med åpne skall, og i høyst 72 timer dersom dette ikke er tilfellet, i en plastpose påført en etikett med opplysninger om østersenes eller blåskjellenes art og opprinnelse. Bløtdyr med åpne skall eller nylig døde bløtdyr skal oppbevares atskilt fra andre bløtdyr.

Et 3–5 mm tykt vevsnett, herunder vev fra gjeller og hjerte, skal benyttes til histologisk diagnostisering av *Marteilia refringens*. En bit av fordøyelseskjertelen skal benyttes i enkelte tester, herunder avtrykk og polymerasekjedereaksjon (PCR).

I.2. Mikroskopiteknikker

I.2.1. Cytologi (avtrykkscytologi)

Etter at vev fra fordøyelseskjertelen er tørket på absorberende papir, lages det en rekke avtrykk på et objektglass. Objektglassene lufttørkes, fikseres i metanol eller i absolutt etanol og farges ved hjelp av et kommersielt tilgjengelig blodfargingssett, f.eks. Diff-Quik®/Hemacolor®, i samsvar med produsentens anvisninger. Etter skylling i springvann og tørking monteres objektglassene med dekkglass ved hjelp av en egnet syntetisk harpiks. Objektglassene observeres først ved $\times 200$ forstørrelse og deretter med immersjonsolje ved $\times 1\,000$ forstørrelse.

Et positivt resultat skal være observasjon av celler i størrelser på opptil 30–40 μm . Cytoplasmaet farges basofilt, mens cellekjernen farges eosinofilt. Det observeres lyse haloer rundt store, sterkt fargede (lysbrytende) granuler og celler intracellulært i større celler.

Teknikken er ikke artsspesifikk for parasitter.

I.2.2. Histologi

Vevsnett som omfatter gjeller, fordøyelseskjertel, kappe og gonade, fikseres i minst 24 timer i Davidsons fikseringsmiddel etterfulgt av normal behandling med henblikk på histologi med parafin og farging, f.eks. med hematoksylin og eosin. Observasjonene foretas ved stigende forstørrelse opp til $\times 1\,000$.

Et positivt resultat skal være observasjon av celler med størrelser fra 4 til 40 μm . Tidlige stadier består av multinukleære celler som er sfæriske til avlange. Disse forekommer hovedsakelig i epitel fra spiserør og magesekk og noen ganger fra leppepalpene. Sporulering omfatter celledelinger inne i celler og finner sted i fordøyelseskjertelens tubuli og ducti. Lysbrytende granuler observeres under sporulering, men ikke i tidlige stadier. I sene faser av en infeksjon observeres det frie sporangier i mage-tarmkanalens lumen. Cytoplasmaet farges basofilt, mens cellekjernen farges eosinofilt. Granulatene kan ha mørk oransje til mørk rød farge.

Teknikken er ikke artsspesifikk for parasitter.

I.3. Molekylære teknikker

I.3.1. DNA-ekstraksjon

DNA skal ekstraheres i henhold til standardframgangsmåter.

Det kan benyttes kommersielt tilgjengelige DNA-ekstraksjonssett som vanligvis gir DNA av høy kvalitet, som er egnet for bruk sammen med PCR-protokollene, som beskrevet i nr. I.3.2.

I.3.2. Polymerasekjedereaksjon (PCR)

Det er utarbeidet og publisert en rekke PCR-protokoller.

Det skal benyttes PCR-primere rettet mot regionen ITS1 (internt transkribert spacer), ettersom de er i stand til bare å amplifisere *M. refringens*.

PCR skal utføres i et volum på 50 µl. PCR-blandinger skal inneholde buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 ved 25 °C] og 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-blanding, 1 µM forover- og reversprimere, 0,02 enheter µl⁻¹ Taq DNA-polymerase og 10–100 ng ekstrahert DNA. Etter denaturering av DNA ved 94 °C i 5 minutter skal det kjøres 30 sykluser som følger: denaturering ved 94 °C i 1 minutt, hybridisering ved 55 °C i 1 minutt og elongering ved 72 °C i 1 minutt per kilobasepar. Det utføres en siste elongering i 10 minutter ved 72 °C. Til påvisning av *M. refringens* utføres det PCR med primere rettet mot regionen ITS1 (5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' og 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3').

Positive kontroller skal bestå av genomisk DNA fra en svært infisert vert eller plasmid-DNA, herunder målregionen.

Negative kontroller skal bestå av genomisk DNA fra ikke-infiserte verter og PCR-reagenser uten mål-DNA.

Et positivt resultat er positiv PCR-amplifisering ved den forventede størrelsen (412 bp), idet alle negative kontroller skal være negative og alle positive kontroller skal være positive.

I.3.3. In situ-hybridisering (ISH)

Det er utarbeidet og publisert en rekke ISH-protokoller.

Proben rettet mot rRNA-genkompleksets SSU skal benyttes, ettersom den er blitt validert med tanke på histologi.

Vevssnitt som omfatter gjeller og fordøyelseskjertel, fikseres i minst 24 timer i Davidsons fikseringsmiddel etterfulgt av normal behandling med henblikk på histologi med parafin. Snitt på 5 µm skjæres og plasseres på aminoalkylsilanbelagte objektglass, som deretter varmes i ovn over natten ved 40 °C. Snittene avvokses i xylenbad i 10 minutter. Dette trinnet gjentas én gang, deretter fjernes løsemidlet i to etterfølgende bad med absolutt etanol, hvert med 10 minutters varighet. Deretter dehydreres snittene ved nedsenking i etanol i stigende konsentrasjoner. Snittene behandles med proteinase K (100 µg ml⁻¹) i TE-buffer (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) ved 37 °C i 30 minutter. Objektglassene dehydreres ved nedsenking i etanol i stigende konsentrasjoner og lufttørkes. Snittene inkuberes med 100 µl hybridiseringsbuffer (4 × SSC [Standard Saline Citrate], 50 % formamid, 1 × Denhardts løsning, 250 µg ml⁻¹ gjær-tRNA, 10 % dekstransulfat) inneholdende 10 ng (1 µl av PCR-reaktantene tillaget som beskrevet i nr. I.3.2 ved bruk av primerne CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG og TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) av den digoksinmerkede proben. Snittene dekkes med in situ-dekkglass av plast og plasseres på en varmeblokk ved 95 °C i 5 minutter. Deretter avkjøles objektglassene på is i 1 minutt før hybridisering over natten ved 42 °C i et fuktammer. Snittene vaskes to ganger i 5 minutter i 2 × SSC ved romtemperatur, og én gang i 10 minutter i 0,4 × SSC ved 42 °C. Påvisningstrinnene utføres i henhold til produsentens anvisninger. Deretter skylles objektglassene i sterilt destillert vann (dH₂O). Snittene motfarges med Bismarck Brown Yellow, skylles i dH₂O og dekkglass monteres ved hjelp av et vandig monteringsmedium.

Positive og negative kontroller skal være snitt fra henholdsvis kjente infiserte og kjente ikke-infiserte verter.

Et positive resultat vises ved lilla-svart merking av *M. refringens*-celler i kjente målvev, idet alle negative kontroller skal være negative og alle positive kontroller positive.

I.3.4. Sekvensering

Sekvensering utføres som et av de siste trinnene for å bekrefte diagnosen. Målregioner er SSU rDNA og ITS1.

II. **Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for overvåking og bekreftelse av infeksjon med *Marteilia refringens***

Med hensyn til overvåkingsprogrammer og for å bekrefte forekomst av en infeksjon med *Marteilia refringens* eller for å utelukke mistanke om denne listeførte sykdommen, i samsvar med kravene fastsatt i del 4 avsnitt II i vedlegg I, skal de diagnostiske metodene og tilhørende framgangsmåter som skal benyttes, være i samsvar med retningslinjene fastsatt i tabell 4.1 som følger:

Tabell 4.1

Retningslinjer for bruk av diagnostiske metoder for overvåkingsprogrammer og for å bekrefte eller utelukke infeksjon med *Marteilia refringens*

| Metode | Måltrettet overvåking | Sannsynlig diagnose | Bekreftende diagnose |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| Avtrykk av fordøyelseskjertel | X | X | X eller |
| Histopatologi | X | | X eller |
| In situ-hybridisering | | | X og |
| PCR | X | X | X og |
| Sekvensering | | | X |

DEL 5

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER FOR OVERVÅKING OG BEKREFTELSE AV INFEKSJON MED *BONAMIA OSTREAE*

I. **Framgangsmåter for diagnostisering av infeksjon med *Bonamia ostreae***

Når det utføres prøvetaking og laboratorieundersøkelse for å oppnå eller opprettholde en viss helsestatus med hensyn til *Bonamia ostreae*, som omhandlet i del 5 avsnitt I i vedlegg I, eller for å bekrefte eller utelukke forekomst av denne listeførte sykdommen i samsvar med artikkel 57 bokstav b) i direktiv 2006/88/EF ved bruk av de diagnostiske metodene beskrevet i del 5 avsnitt II i vedlegg I, skal de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i følgende nr. I.1, I.2 og I.3 benyttes.

I.1. Prøvetakingsprosess

For å øke sjansene for å finne infiserte dyr, skal det prioriteres å ta prøver av individuelle bløtdyr med åpne skall eller nylig døde bløtdyr.

Etter prøvetaking oppbevares østersene ved 4 °C eller kjølt på is i høyst 24 timer dersom prøvene omfatter bløtdyr med åpne skall, og i 72 timer dersom dette ikke er tilfellet, i en plastpose påført en etikett med opplysninger om østersenes art og opprinnelse. Bløtdyr med åpne skall eller nylig døde bløtdyr skal oppbevares atskilt fra andre bløtdyr.

Et 3–5 mm tykt vevsnett, herunder vev fra gjeller og hjerte, skal benyttes til histologisk diagnostisering av *Bonamia ostreae*. En bit av fordøyelseskjertelen skal benyttes i enkelte tester, herunder avtrykk og polymerasekjedereaksjon (PCR).

I.2. Mikroskopiteknikker

I.2.1. Cytologi (avtrykkscytologi)

Etter at vev fra gjeller eller hjerte er tørket på absorberende papir, lages det en rekke avtrykk på et objektglass. Objektglassene lufttørkes, fikseres i metanol eller i absolutt etanol og farges ved hjelp av et kommersielt tilgjengelig blodfargingssett, f.eks. Diff-Quik®/Hemacolor®, i samsvar med produsentens anvisninger. Etter skylling i springvann og tørking monteres objektglassene med dekkglass ved hjelp av en egnet syntetisk harpiks. Objektglassene observeres først ved $\times 200$ forstørrelse og deretter med immersjonsolje ved $\times 1\,000$ forstørrelse.

Et positivt resultat er forekomst av små sfæriske eller eggformede organismer (2–5 μm brede) i hemocytter. Parasitten kan imidlertid også forekomme ekstracellulært. Disse organismene har basofilt cytoplasma og eosinofil cellekjerne (fargene kan variere avhengig av hvilken farge som er benyttet), og ettersom de strykes ut på objektglasset, kan de virke bredere på avtrykk enn ved en histologisk undersøkelse. Multinukleære celler kan observeres. Teknikken er ikke artsspesifikk for parasitter.

I.2.2. Histologi

Vevssnitt som omfatter gjeller og fordøyelseskjertel, fikseres i minst 24 timer i Davidsons fikseringsmiddel etterfulgt av normal behandling med henblikk på histologi med parafin og farging, f.eks. med hematoksylin og eosin. Observasjonene foretas ved stigende forstørrelse opp til $\times 1\,000$.

Et positivt resultat skal være forekomst av parasitter som svært små celler med en bredde på 2–5 μm i hemocytterne, eller frie i bindevev eller sinus i gjelle-, tarm- og kappeepitel, noe som ofte er forbundet med en kraftig betennelsesreaksjon. For å unngå enhver tvil skal parasitten observeres inne i hemocytten med henblikk på en positiv diagnose. Teknikken er ikke artsspesifikk for parasitter.

I.3. Molekylære teknikker

I.3.1. DNA-ekstraksjon

DNA skal ekstraheres i henhold til standardframgangsmåter.

Det kan benyttes kommersielt tilgjengelige DNA-ekstraksjonssett som vanligvis gir DNA av høy kvalitet, som er egnet for bruk sammen med PCR-protokollene som beskrevet nedenfor.

I.3.2. Polymerasekjedereaksjon (PCR)

Det er utarbeidet og publisert en rekke PCR-protokoller.

To PCR-protokoller rettet mot SSU rDNA kan benyttes:

- Den første er konvensjonell PCR som amplifiserer flere medlemmer av *Haplosporidia*, herunder *Bonamia* spp. Primerne, som betegnes Bo og Boas, er henholdsvis 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' og 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3' og amplifiserer et produkt på 300 bp. PCR-blandinger inneholder buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 ved 25 °C] og 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-blanding, 1 μM forover- og reversprimere, 0,02 enheter μl^{-1} Taq DNA-polymerase og 0,2 ng μl^{-1} av DNA-templatet i et samlet volum på 50 μl . Prøvene denatureres i en termosyklus i 5 minutter ved 94 °C etterfulgt av 30 sykluser (94 °C i 1 minutt, 55 °C i 1 minutt, 72 °C i 1 minutt), deretter foretas en siste elongering i 10 minutter ved 72 °C.

Positive kontroller skal bestå av genomisk DNA fra en svært infisert vert eller plasmid-DNA, herunder målregionen.

Negative kontroller skal bestå av genomisk DNA fra ikke-infiserte verter og PCR-reagenser uten mål-DNA.

Et positivt resultat er positiv PCR-amplifisering ved den forventede størrelsen (dvs. 300 bp), idet alle negative kontroller skal være negative og alle positive kontroller skal være positive.

- b) Den andre PCR-protokollen er en sanntids-PCR-analyse med SYBR® Green. Den muliggjør spesifikk påvisning av *B. ostreae* (som beskrevet nedenfor), og kan kombineres med en sanntids-PCR-analyse med SYBR® Green som muliggjør spesifikk påvisning av *B. exitiosa* (Ramilo et al. 2013).

Primerne BOSTRE-F (5'- TTACGTCCTGCCCTTTGTA-3') og BOSTRE-R (5'- TCGCGGTTGAATTT-TATCGT-3') amplifiserer et produkt på 208 bp. PCR-blandinger inneholder SYBR® Green Master Mix (1X), 0,3 µM forover- og reversprimere og 200 ng ekstrahert DNA. Prøvene skal denatureres i et sanntids-påvisningssystem i 10 minutter ved 95 °C etterfulgt av 35 sykluser (95 °C i 30 sekunder, 55 °C i 45 sekunder og 72 °C i 1 minutt). Smeltekurven analyseres ved å øke temperaturen fra 55 °C til 95 °C i trinn på 0,5 °C/s og ved å registrere fluorescens ved hver temperaturendring.

Positive kontroller skal bestå av genomisk DNA fra en svært infisert vert eller plasmid-DNA, herunder målregionen.

Negative kontroller skal bestå av genomisk DNA fra ikke-infiserte verter og PCR-reagenser uten mål-DNA.

Et positivt resultat skal være positiv PCR-amplifisering med en unik maksimal smeltetemperatur ($78,25 \pm 0,25$ °C under forholdene publisert av Ramilo et al. 2013), idet alle negative kontroller skal være negative og alle positive kontroller skal være positive.

I.3.3. *In situ*-hybridisering (ISH)

Det er utarbeidet og publisert en rekke ISH-protokoller.

Det skal benyttes en probe rettet mot rDNA-genkompleksets SSU, selv om det er vist at den kan kryss reagere med enkelte andre medlemmer av familien *Haplosporidia*.

Vevsnett som omfatter gjeller og fordøyelseskjertel, fikseres i minst 24 timer i Davidsons fikseringsmiddel etterfulgt av normal behandling med henblikk på histologi med parafin. Snitt på 5 µm skjæres og plasseres på aminoalkylsilanbelagte objektglass, som deretter varmes i ovn over natten ved 40 °C. Snittene avvokses i xylenbad i 10 minutter. Dette trinnet gjentas én gang, deretter fjernes løsemidlet i to etterfølgende bad med absolutt etanol, hvert med 10 minutters varighet. Deretter dehydreres snittene ved nedsenking i etanol i stigende konsentrasjoner. Snittene behandles med proteinase K (100 µg ml⁻¹) i TE-buffer (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) ved 37 °C i 30 minutter. Objektglassene dehydreres ved nedsenking i etanol i stigende konsentrasjoner og lufttørkes. Snittene inkuberes med 100 µl hybridiseringsbuffer (4 × SSC [Standard Saline Citrate], 50 % formamid, 1 × Denhardts løsning, 250 µg ml⁻¹ gjær-tRNA, 10 % dekstransulfat) inneholdende 20 ng (2 µl av PCR-reaksjonen tillaget som beskrevet i nr. I.3.2 ved bruk av primerne Bo og Boas) av den digoksigeninmerkede proben. Snittene dekkes med *in situ*-dekkglass av plast og plasseres på en varmeblokk ved 95 °C i 5 minutter. Deretter avkjøles objektglassene på is i 1 minutt før hybridisering over natten ved 42 °C i et fuktammer. Snittene vaskes to ganger i 5 minutter i 2 × SSC ved romtemperatur, og én gang i 10 minutter i 0,4 × SSC ved 42 °C. Påvisningstrinnene skal utføres i henhold til produsentens anvisninger. Deretter skylles objektglassene i sterilt destillert vann (dH₂O). Snittene motfarges med Bismarck Brown Yellow, skylles i dH₂O og dekkglass monteres ved hjelp av et vandig monteringsmedium.

Positive og negative kontroller skal være snitt fra henholdsvis kjente infiserte og kjente ikke-infiserte verter.

Et positivt resultat skal svare til de merkede parasittene inne i hemocytene, idet alle negative kontroller skal være negative og alle positive kontroller skal være positive.

I.3.4. Sekvensering

Sekvensering utføres som et av de siste trinnene for å bekrefte diagnosen. Målregioner er SSU rDNA og ITS1.

II. Framgangsmåter for overvåking og bekreftelse av infeksjon med *Bonamia ostreae*

Med henblikk på overvåking og for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om infeksjon med *Bonamia ostreae* i samsvar med kravene fastsatt i del 5 avsnitt II i vedlegg I skal de diagnostiske metodene og tilhørende framgangsmåter som skal benyttes, være i samsvar med retningslinjene fastsatt i tabell 5.1 som følger:

Tabell 5.1

Retningslinjer for bruk av diagnostiske metoder for overvåkingsprogrammer og for å bekrefte eller utelukke infeksjon med *Bonamia ostreae*

| Metode | Måltrettet overvåking | Sannsynlig diagnose | Bekreftende diagnose |
|---------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| Avtrykk av hjerte eller gjeller | X | X | X eller |
| Histopatologi | X | | X eller |
| In situ-hybridisering | | | X og |
| PCR | X | X | X og |
| Sekvensering | | | X |

DEL 6

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER FOR OVERVÅKING OG BEKREFTELSE AV HVITFLEKKS sykdom (WSD)

1. Diagnostiske framgangsmåter for påvisning av hvitflekksyndromvirus (WSSV)

Når det utføres prøvetaking og laboratorieundersøkelse med henblikk på overvåkings- og utryddelsesprogrammene omhandlet i del 6 avsnitt I i vedlegg I, og for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om infeksjon med WSSV i samsvar med artikkel 57 bokstav b) i direktiv 2006/88/EF ved bruk av de diagnostiske metodene beskrevet i del 6 avsnitt II i vedlegg I, skal de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i nr. 2–7 i denne del benyttes.

Metodene og framgangsmåtene beskrevet i denne del av vedlegg II er tilpasset etter den ISO 17025-akkrediterte testen som benyttes på Den europeiske unions referanselaboratorium for krepsdyr sykdommer. Alternative metoder, der det benyttes tilsvarende sett produsert av andre produsenter og tilsvarende forhold, som gir tilsvarende følsomhet og spesifisitet som dem som er beskrevet i denne del, kan benyttes. Det PCR-amplifiserte produktet skal under alle omstendigheter sekvenseres for å bekrefte WSSV.

2. Prøvetakingsprosess

Vev (pleopoder og gjeller) som inneholder WSSV fra krepsdyr, kan oppbevares i etanol, RNAlater eller hurtiginnfrysves ved –80 °C. Følgende trinn skal utføres for å identifisere WSSV fra vevsprøver: homogenisering av vevet, ekstraksjon av DNA, spesifikk amplifisering av DNA fra WSSV ved bruk av PCR, visualisering av det amplifiserte produktet på en gel, rensing av DNA og sekvensering for å bekrefte det sykdomsframkallende virusets identitet.

3. Vevshomogenisering

Oppkutting av vevet og tillaging av et homogenat i en egnet buffer skal utføres ved bruk av FastPrep homogenisator og Lysing Matrix A-rør (MP Biomedicals). Vevet veies, plasseres i Lysing Matrix A-rør, fortynnes 1:10 w/v eller i henhold til produsentens anvisninger i en egnet buffer (G2 og 10 µl proteinase K til bruk med DNA Tissue kit [Qiagen]) og homogeniseres med FastPrep-24 homogenisator i 2 minutter. Homogeniserte prøver inkuberes ved 56 °C i minst 4 timer eller over natten. Prøvene vortekseres, sentrifugeres ved 9 000 rpm i 2 minutter, og 50 µl supernatant eller et volum tilsvarende 5 mg vev (vevsvekten som er optimal for ekstraksjonssettet), tilsettes i et prøverør for DNA-ekstraksjon og fylles med G2-buffer opp til 200 µl.

4. DNA-ekstraksjon

Totalt DNA skal ekstraheres ved hjelp av et DNA-ekstraksjonssett for vev og EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen) i henhold til produsentens anvisninger. En ekstraksjonskontroll (DNA fra kalvebrissel) og en negativ kontroll (G2-buffer) skal kjøres med hvert parti med prøver. DNA elueres i et volum på 50 µl. For å sikre en vellykket ekstraksjon bestemmes DNA-konsentrasjonen for alle prøver og kontroller ved hjelp av en Nano Drop-maskin. Ekstrahert DNA fryses ved –20 °C dersom det ikke skal benyttes med det samme.

5. Polymerasekjedereaksjon (PCR) for WSSV

Metoden som skal benyttes til å påvise WSSV, skal være protokollen for påvisning av WSSV ved hjelp av flettet PCR som beskrives i følgende ledd, og som amplifiserer 18s rRNA-genets 1 447 bp- og 848 bp-amplikon i henholdsvis første og andre PCR-runde.

Den første PCR-reaksjonsrunden utføres i et volum på 50 µl som inneholder sluttkonsentrasjoner på 1 × GoTaq Buffer (Promega), 5 mM MgCl₂, 1 pmol/µl WSSV 146 F1-primer, 1 pmol/µl WSSV 146 R1-primer (tabell 1), 0,25 mM dNTPs, 1,25U Taq-polymerase og 2,5 µl DNA. Hver prøve kjøres i duplikat sammen med en negativ ekstraksjonskontroll, en negativ PCR-kontroll (tilsatt 2,5 µl H₂O istedenfor DNA) og en positiv kontroll. Den positive kontrollen skal være fortynt WSSV-plasmid som er framstilt og validert for intern bruk (fås fra EURL).

Den andre PCR-reaksjonsrunden skal utføres på samme måte som første runde, men ved bruk av primersetet WSSV 146 F2/R2 og med ytterligere en positiv kontroll for å kontrollere at dette trinnet i PCR har fungert.

| Primer | Sekvens |
|-------------|---------------------------|
| WSSV 146 F1 | ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG |
| WSSV 146 R1 | TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA |
| WSSV 146 F2 | GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA |
| WSSV 146 R2 | TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT |

Både første og andre PCR-runde skal utføres ved hjelp av følgende sykluser på en DNA Engine Tetrad 2 Peltier termosykluser (eller tilsvarende): En første denaturering ved 94 °C i 2 minutter etterfulgt av 94 °C i 30 sekunder, 62 °C i 30 sekunder, 72 °C i 30 sekunder gjentatt i 30 sykluser, et elongeringstrinn ved 72 °C i 2 minutter, deretter holdes reaksjonen ved 4 °C.

6. Gelelektroforese

Amplifiserte PCR-produkter fra både første og andre PCR-runde visualiseres på 2 % agarosegel med TAE-buffer. 15 µl av hver prøve kjøres ved 120 V i cirka 20 minutter og undersøkes under UV-lys. Positive prøver vil gi et bånd på 1 447 bp i første PCR-runde og 848 bp i andre PCR-runde. Prøver av denne størrelsen skjæres ut og plasseres i et 1,5 ml mikrosentrifugerør. DNA i gelbitene renses med Promega Wizard® SV Gel og PCR Clean-Up System i henhold til produsentens anvisninger. DNA-konsentrasjonen anslås ved hjelp av en Nano Drop-maskin. Renset DNA fryses ved –20 °C dersom det ikke skal benyttes med det samme.

7. Sekvensering av PCR-produkter

DNA sekvenseres med Big Dye Terminator Kit v3,1 (Applied Biosystems). Det samlede volumet i hver reaksjon er 20 µl, idet sluttkonsentrasjonene er 1 × Big Dye Terminator, 1 × sekvenseringsbuffer, 10 pmol/µl forover- eller reversprimer og 10 µl rensed DNA (fortynnet til cirka 10 ng/µl) som kjøres ved bruk av følgende sykluser på en DNA Engine Tetrad 2 Peltier termosykluser (eller tilsvarende): 94 °C i 30 sekunder etterfulgt av 96 °C i 10 sekunder, 50 °C i 10 sekunder og 60 °C i 4 minutter, idet de siste tre trinnene gjentas 30 ganger.

PCR-produktene utfelles ved hjelp av en natriumacetatmetode der 20 µl DNA tilsettes i 10 µl NaAc, 70 µl H₂O og 250 µl etanol, vortekseres og sentrifugeres ved 13 000 rpm i 20 minutter, supernatanten fjernes og pelleten vaskes med 200 µl absolutt etanol og sentrifugeres ved 13 000 rpm i 5 minutter. Pelleten tørkes i 5 minutter ved 37 °C. 25 µl Hi-Di-formamid tilsettes i pelletene, varmes opp til 95 °C i 2 minutter og vortekseres grundig. Prøvene skal sekvenseres ved hjelp av ABI3130xl Avant Genetic Analyzer i henhold til produsentens anvisninger. Sekvenseringsresultatene skal analyseres med programvaren Sequencher, og sekvensene skal sammenlignes med sekvensene i NCBI's database ved hjelp av BLAST-funksjonen.
